



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Fisiología

**Estudio in vitro del estado funcional del
endotelio de las arterias esplácnicas de
pacientes con insuficiencia hepática terminal.
Papel de los radicales libres de oxígeno.**

TESIS DOCTORAL

Adely B. Salcedo Guerrero

Madrid, 2007



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

**Estudio in vitro del estado funcional del endotelio de
las arterias esplácnicas de pacientes con insuficiencia
hepática terminal. Papel de los radicales libres de
oxígeno.**

Tesis Doctoral presentada por:
Adely B. Salcedo Guerrero
para optar al grado de Doctor

Madrid, 2007

Este trabajo fue subvencionado, en parte,
por la Fundación Médica Mútua Madrileña
Automovilística, y Ministerio de Educación
y Ciencia (BFU2004-04054).

.



Facultad de Medicina
Departamento de Fisiología

Godofredo Diéguez Castrillo, Catedrático de Fisiología, y Luís Monge Sánchez, Profesor Titular de Fisiología, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICAN: Que D^a Adely B. Salcedo Guerrero ha realizado bajo su dirección el presente trabajo titulado “**Estudio in vitro del estado funcional del endotelio de las arterias esplácnicas de pacientes con insuficiencia hepática terminal. Papel de los radicales libres de oxígeno**” para optar al Grado de Doctor dentro del Programa Interuniversitario de Doctorado en FISIOLÓGÍA.

Para que conste, firmamos el presente en Madrid a 5 de junio de 2007.

AGRADECIMIENTO

Quiero resaltar mi especial agradecimiento a los directores de esta tesis, al Dr. Godofredo Diéguez Castrillo, por su colaboración e interés en mi formación científica y académica, por sus substanciales sugerencias durante la redacción de esta Tesis así como por su inteligencia a la hora de orientar el trabajo y por ser un ejemplo como buen investigador. Muchas gracias. Y al Dr. Luis Monge por la inestimable ayuda en la realización de los experimentos y en el uso de los recursos informáticos para el análisis y presentación de los datos obtenidos en la realización de esta tesis.

A los Dres. Valentín Cuervas-Mons, Víctor Sánchez Turrión y Jesús Garijo, y al resto de los miembros de la Unidad de Transplante Hepático Clínica “Puerta de Hierro”, Madrid, por su colaboración y facilitación del material humano.

A la Dra. Nuria Fernández Monsalve por ser una persona incondicional, que brinda todo su apoyo, paciencia, compromiso, comprensión y cariño. Muchas Gracias por estar y por compartir tus conocimientos conmigo.

Al Dr. Angel Luis García-Villalón por el entusiasmo y la colaboración que me ha prestado con sus acciones y sus palabras oportunas, por estar siempre presente para aclarar mis dudas y por su inestimable ayuda en la realización de los experimentos.

A las Dras. Belén Climent y Ana Sánchez por su gran ayuda y disponibilidad en mi comienzo en el laboratorio y por su inestimable apoyo en las labores compartidas.

A Raúl Narváez por su agradable compañía y por el trabajo que hemos compartido en estos últimos meses.

A Esther Martínez por esas agradables charlas que hemos compartido y por su buen humor.

A Hortensia Fernández-Lomana por su asistencia técnica en la preparación de los experimentos.

A todos los miembros del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, por el buen ambiente de trabajo y convivencia, y por brindarme siempre su apoyo en los momentos necesarios, en especial a Fatima y Rosa por los buenos momentos compartidos.

A la Fundación Mutua Madrileña Automovilística por haberme concedido la beca, que me ha permitido realizar este trabajo.

A mi Papá sin cuyo esfuerzo no habría cumplido este sueño y esta meta de completar mis estudios. Gracias por toda la confianza depositada en mí. A mi Mamá, que aun cuando no esta presente, ilumina mi camino y desde otro plano cuida de mí. Gracias por todo aquello que me enseñaste.

A mis hermanas Lorena, Daniela y Marisabel por su apoyo incondicional y dedicación, y por el gran cariño que siempre me han demostrado, por sus oraciones y por estar siempre conmigo.

A quienes completan la base de mi felicidad, mi familia.

A todos mis amigos, de aquí y de allá, por el interés que siempre han demostrado en mi trabajo y por todos esos buenos momentos compartidos.

A Dios, por todas sus bendiciones y por poner a todas estas personas tan Especiales en mi vida!.

A todos ellos, simplemente **MUCHAS GRACIAS**

*A RUBEN DARIO Y RUBEN ERNESTO,
GRACIAS POR EL GRAN AMOR QUE ME
BRINDAN.*

ÍNDICE

PROLOGO	iii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	24
MATERIAL Y MÉTODOS	28
Pacientes	29
Procedimiento experimental	30
Protocolo experimental.....	37
Análisis estadístico de los resultados	39
Sustancias utilizadas	40
RESULTADOS.....	42
DISCUSIÓN	62
RESUMEN Y CONCLUSIONES	79
BIBLIOGRAFÍA	84



Prometeo lleva el fuego a la humanidad (Heinrich Friedrich Füger, c. 1817).

PROLOGO

Desde los tiempos más remotos y durante muchos años el hígado fue considerado como el órgano más importante de los animales y del hombre, y su examen se utilizó en la adivinación de los fenómenos favorables y desfavorables. Probablemente por esto, se empezó a conocer pronto la circulación esplácnica (**splanchnikós**, víscera), y rastrear la historia de esta circulación puede ser muy útil para conocer la historia de la circulación sanguínea. Los pueblos de Mesopotamia llamaban al hígado **kabittu** (pesado), los griegos **hepar** y los latinos **jecur**. En español, la palabra hígado deriva de ficatum (de higo; **hepar sykoton, jecur ficatum**, hígado de, o con higo).

Es el órgano más grande de los seres humanos y su función se ha ido conociendo a lo largo de los años, y también sus enfermedades. La cirrosis (**kirrhos**, amarillo) fue descrita por primera vez por Giovanni Battista Morgagni en 1760. Cuando los tratamientos médicos fracasan y las condiciones del enfermo lo permiten, se practica el trasplante de hígado. Esto se inició experimentando en animales en el siglo XIX y de forma más científica en 1955 cuando se hizo en un perro. El primer trasplante humano se llevó a cabo en 1963, y actualmente ofrece una curación superior al 75 % con una calidad de vida muy satisfactoria.

La importancia del hígado en la antigüedad podría explicar las referencias mitológicas a este órgano. Prometeo (previsión, prospección) era un hijo de Jápeto y la oceánide Clímene, era hermano de Atlas, Epimeteo y Menecio, a los que superaba en astucia y engaños. Perteneció a la segunda generación humana que vivió en una Edad de Plata. Estos eran seres humanos bastante inferiores a los primeros,

holgazanes, y padecían una permanente estupidez. Pero Prometeo, hijo de uno de los Titanes y también titán, robó a Zeus el fuego que estaba reservado exclusivamente a los inmortales, y lo entregó a los hombres para que mejoraran su situación. Como introductor del fuego e inventor del sacrificio, Prometeo es considerado el protector de la civilización humana.

Prometeo, sin embargo, hizo varias cosas que no gustaron a Zeus, por lo que éste hizo que le llevaran al monte Cáucaso, donde fue encadenado por Hefesto con la ayuda de Bía y Cratos. Zeus envió un águila (hija de los monstruos Tifón y Equidna) para que se comiera el hígado de Prometeo. Siendo éste inmortal, su hígado volvía a crecerle cada día, y el águila volvía a comérselo cada noche. Este castigo había de durar 30.000 años, pero a los 30 años Heracles pasó por el lugar de cautiverio de Prometeo de camino al jardín de las Hespérides y le liberó disparándole una flecha al águila. Prometeo fue invitado a volver al Olimpo, aunque debía llevar con él la roca a la que fue encadenado.



Vulcano encadenando a Prometeo (Dirck van Baburen, 1623).

INTRODUCCIÓN

La cirrosis hepática representa un serio problema sanitario que en España afecta al 1-2 % de la población. A pesar de la morbilidad y mortalidad perioperatorias, el trasplante de hígado se considera el tratamiento más indicado en pacientes escogidos cuya hepatopatía aguda o crónica es progresiva y no mejora con terapia médica.

La cirrosis es una entidad definida histopatológicamente, que se acompaña de un espectro de manifestaciones clínicas características (Cheng R.T. y Podolsky D.K. 2006). Los análisis anatómo-patológicos reflejan desorganización de la arquitectura normal del hígado con daño crónico e irreversible del parénquima hepático consistente en fibrosis y formación de nódulos de regeneración (Figura 1). El proceso puede considerarse como la vía final común de muchos tipos de lesión crónica del hígado. Las manifestaciones clínicas de la cirrosis son consecuencia de las alteraciones morfológicas y a menudo reflejan la gravedad de la lesión hepática más que la etiología de la hepatopatía subyacente. La disminución de la masa hepatocelular funcionante puede originar ictericia, edema, coagulopatía y alteraciones metabólicas. La fibrosis y la distorsión vascular conducen a hipertensión portal y sus complicaciones, principalmente varices esofágicas y esplenomegalia. La ascitis y la encefalopatía hepática son consecuencia tanto de la insuficiencia hepatocelular como de la hipertensión portal (Figura 2).



Figura 1. Fotografía de un hígado con cirrosis (arriba) y un hígado sano (abajo)



Figura 2. Paciente con insuficiencia hepática.

La cirrosis hepática se puede clasificar según criterios morfológicos, etiológicos o clínicos. Una clasificación apropiada podrá ser la basada en función de criterios etiológicos y morfológicos, a saber: 1) alcohólica; 2) criptógena y post-hepatítica; 3) biliar; 4) cardíaca, y 5) otras (metabólica, hereditaria, producida por medicamentos) (Cheng R.T. y Podolsky D.K. 2006). La cirrosis alcohólica es la forma más frecuente (40-50 % de los casos en España) (Farreras V, 2006). Se considera que el tiempo mínimo de alcoholismo requerido para que el tóxico origine una cirrosis es de 10 años, aunque puede desarrollarse en menor tiempo en pacientes consumidores de grandes cantidades de alcohol. Está frecuentemente asociada con otras formas de lesión hepática, como el hígado graso alcohólico y la hepatitis alcohólica. La cirrosis post-hepatitis o posnecrótica es la vía final común de muchos tipos de lesión hepática crónica. Las pruebas epidemiológicas y serológicas sugieren que en el 25-75% de los casos de dicha forma existen antecedentes de hepatitis vírica (hepatitis B o C). En algunos pacientes con infección crónica por el virus B se encuentra además infección concomitante para el virus D (delta). La cirrosis post-hepatitis también puede aparecer en individuos con hepatitis autoinmunitaria. La denominación cirrosis criptógena se ha utilizado en el mismo sentido que cirrosis post-hepatitis, pero debería reservarse para los casos en que se desconoce la etiología de la cirrosis. La cirrosis biliar se debe a lesión u obstrucción prolongada del sistema biliar intrahepático o extrahepático. Puede ser cirrosis biliar primaria y/o cirrosis biliar secundaria, y aún siendo entidades diferentes desde un punto de vista fisiopatológico, muchos de los rasgos clínicos son similares. Otros tipos son los originados por

factores metabólicos, hereditarios y secundarios a medicamentos. Aunque algunos de estos procesos muestran rasgos clínicos o morfológicos característicos, las manifestaciones clínicas suelen ser independientes del mecanismo patógeno subyacente.

En los pacientes con cirrosis avanzada suele haber complicaciones hemodinámicas que son independientes de la etiología de la hepatopatía de base, y entre estas complicaciones destaca la presencia de un estado circulatorio hiperdinámico.. Nosotros estamos particularmente interesados en este estado circulatorio hiperdinámico que acompaña a la cirrosis.

La cirrosis hepática puede producir aumento de la resistencia vascular intrahepática ocasionado por los cambios morfológicos del hígado, y por la participación de células productoras de sustancias vasoactivas (endotelina, NO) (Albornoz L et al., 1998). El aumento de la resistencia vascular intrahepática conlleva dificultad en el flujo sanguíneo del sistema porta, lo cual combinado con el incremento del flujo arterial esplácnico produce marcada hipertensión portal. En condiciones normales, la vena porta proporciona el 75% del flujo sanguíneo hepático, y el 25% restante lo proporciona la arteria hepática (Bauer C et al., 1997). El incremento en la resistencia intrahepática al flujo sanguíneo portal es el factor primario en el desarrollo de la hipertensión portal, siendo esta complicación la principal causa de morbilidad y mortalidad de los pacientes cirróticos (Bosh J, et al., 2000). Dado que el sistema venoso porta carece de válvulas, la resistencia ejercida en cualquier tramo de dicho sistema, entre las cavidades cardíacas derechas y los vasos esplácnicos, induce de forma retrógrada el aumento de presión. Con respecto a los

sinusoides hepáticos, la resistencia al flujo sanguíneo portal puede aumentar a tres niveles: 1) presinusoidal, 2) sinusoidal y 3) postsinusoidal. La obstrucción del compartimiento venoso presinusoidal puede localizarse anatómicamente fuera del hígado (p. e., trombosis de la vena porta) o dentro de él, pero proximalmente a los sinusoides hepáticos, de modo que el parénquima hepático no se ve expuesto a la hipertensión venosa. La obstrucción postsinusoidal puede originarse también fuera del hígado, en las venas suprahepáticas (p. e., síndrome de Budd-Chiari) o en la vena cava inferior, o, con menor frecuencia, dentro del hígado (p. e., enfermedad veno-oclusiva). Cuando la cirrosis se complica con hipertensión portal, el aumento de la resistencia vascular suele ser sinusoidal. Si bien la diferenciación entre procesos presinusoidales, sinusoidales y postsinusoidales es conceptualmente interesante, el aumento de la resistencia al flujo portal en un mismo paciente puede acaecer en más de un nivel. La cirrosis es la causa más frecuente de hipertensión portal en Estados Unidos, pues más de 60% de los pacientes con cirrosis tienen hipertensión portal clínicamente significativa. La obstrucción de la vena porta es la segunda causa por orden de frecuencia; la trombosis de las venas suprahepáticas (síndrome de Budd-Chiari) y la enfermedad veno-oclusiva son causas relativamente raras de hipertensión portal. Las principales manifestaciones clínicas de la hipertensión portal son hemorragia por varices gastroesofágicas, esplenomegalia con hiperesplenismo, ascitis, y encefalopatía hepática aguda y crónica. La ausencia de válvulas en el sistema porta facilita el flujo retrógrado (hepatófugo) de la sangre desde el sistema venoso porta de presión elevada a la circulación venosa sistémica, cuya presión es más baja.

La hipertensión portal secundaria a cirrosis es irreversible, y en pacientes seleccionados adecuadamente, el trasplante hepático puede ser beneficioso.

Otra alteración hemodinámica que se suele manifestar en los pacientes con cirrosis es un estado circulatorio hiperdinámico que incluye hipotensión arterial sistémica, aumento del gasto cardíaco y vasodilatación sistémica, incluida la circulación esplácnica (Hadoke PW y Hayes PC, 1997). Estos cambios hemodinámicos se suelen asociar con hipoalbuminemia y retención de sodio, lo cual lleva al incremento del volumen sanguíneo circulante y contribuye a las complicaciones presentes en los pacientes con cirrosis avanzada.

Los mecanismos implicados en la vasodilatación sistémica que aparece durante la cirrosis no son bien conocidos, y se ha considerado que podría deberse a una excesiva producción de sustancias vasodilatadores endógenas (NO, glucagón, péptido natriuretico atrial, prostaciclina, sustancia P, calcitonina) (Benoit JN et al., 1984; Sitzmann JV et al., 1989; Vilar E et al., 2004) y/o a una disminución en la respuesta vascular a vasoconstrictores endógenos (endotelina, arginina vasopresina, catecolaminas, factor activador de plaquetas, sistema renina-angiotensina-aldosterona, tromboxano A₂, interleuquina) (Kiel JW et al., 1985; Lunzer MR et al., 1975; Pizcueta MP et al., 1990; Vilar E et al., 2004). Esta idea, sin embargo, no ha podido ser confirmada en todos los estudios.

Estudios in vivo describen que existe disminución de la respuesta vascular a la angiotensina II, conservando normal la respuesta a la noradrenalina

(Laragh et al., 1963; Ames et al., 1965), disminución de la sensibilidad vascular a la angiotensina II, noradrenalina y fenilefrina (Lunzer et al., 1975; MacGilchrist et al., 1991), y que la respuesta vascular a la noradrenalina y angiotensina II no está afectada durante la cirrosis (Lunzer et al., 1975; Lenz et al., 1985). Estas discrepancias podrían deberse a las diferencias metodológicas de estos estudios; por ejemplo, comparar la respuesta de la presión arterial sistémica y la del flujo sanguíneo en el antebrazo. Interpretar los resultados obtenidos in vivo no es fácil, por lo cual este tipo de estudios se ha ido sustituyendo por el estudio de vasos sanguíneos aislados, que aunque tiene la limitación propia de este método, es más fácil de llevarla a cabo y de valorar los resultados. Las investigaciones con vasos sanguíneos humanos aislados son escasas, y la mayoría de ellas se ha llevado a cabo utilizando arterias hepáticas obtenidas de pacientes cirróticos recogidas durante el transplante hepático. La arteria hepática pertenece a la circulación esplácnica y se ha demostrado su vasodilatación durante la cirrosis, por lo que esta arteria se considera adecuada para estudiar el estado de la función vascular durante esta enfermedad (Hadoke y Hayes, 1997). Además de la arteria hepática, otros vasos sanguíneos que se han utilizado para el estudio de la función vascular en los pacientes cirróticos han sido arterias intrahepáticas (Battaglia et al., 1996), la vena porta (Heller et al., 1996) y la vena del antebrazo (Ryan et al., 1996). La selección del tipo de vasos es importante, debido a que las alteraciones vasculares en la cirrosis varían entre los diferentes territorios vasculares. Por ejemplo, los vasos espláncnicos están dilatados, mientras que los vasos renales están contraídos (Schrier y Caramelo, 1988).

Cinco investigaciones realizadas utilizando arterias hepáticas humanas indican que estas arterias tenían el endotelio dañado (Smith et al., 1993 a, b; Hadoke et al., 1996 a, b; Heller et al., 1996). Tres de estos estudios muestran, además, disminución de la respuesta a la fenilefrina y metoxamina, agonistas selectivos de los receptores adrenérgicos α_1 , (Smith et al., 1993 a, b; Heller et al., 1996). Los otros dos estudios, sin embargo, indican que la respuesta a noradrenalina, fenilefrina y cloruro potásico era normal, sugiriendo que la respuesta del músculo liso vascular no está alterada en la cirrosis (Hadoke et al., 1996 a, b). Smith et al. (1993 a, b) concluyen que está aumentada la liberación de NO, debido a la activación de la sintasa de NO inducible en el músculo liso vascular. También se demostró la actividad del ARN mensajero para esta sintasa en arterias hepáticas recogidas de pacientes con cirrosis (Robinsón et al., 1995). Uno de los debates abiertos es acerca de si el endotelio se daña o no durante la cirugía del trasplante. Hadoke et al. (1996 a, b) y Smith et al. (1993 a, b) sugieren que si se daña. Sin embargo, estudios realizados en arterias hepáticas obtenidas de pacientes con carcinoma hepatocelular y sometidos a resección hepática parcial exhiben que la respuesta arterial a la acetilcolina y a la adenosina difosfato (ADP) es normal, sugiriendo que el endotelio se conserva en buenas condiciones tras la cirugía (Jeng L-BB, et al., 1996).

La escasa disponibilidad de vasos humanos ha conducido al uso de modelos animales, aun cuando estos modelos no reproducen completamente la cirrosis en el ser humano (Tsukamoto et al., 1991). En estos modelos se han utilizado ratones (Zern et al., 1983), ratas (Procter y Chatarra, 1982), conejos

(Jensen et al., 1987), perros (Bomzon y Blendis, 1990) y primates (Bomzon et al., 1978). Para inducir la cirrosis se han utilizado diversos procedimientos. La cirrosis inducida por carbón tetraclorhídrico y fenobarbital produce hipotensión arterial, incremento del gasto cardíaco y aumento del flujo sanguíneo renal y esplácnico, con hipertensión portal (López-Novoa, 1988). La estenosis de la vena porta causa un marcado incremento de la presión portal (Bomzon y Blendis, 1987) sin ictericia o cirrosis (Halversen y Myking, 1974), y se acompaña de aumento del flujo sanguíneo esplácnico y del gasto cardíaco. Este modelo es uno de los más usados para estudiar la función vascular. En la inducida por ligadura del conducto biliar, las características e interpretación de este modelo dependen del método usado (conducto biliar intacto o resecado) (Better y Bomzon, 1988). La técnica más común es la ligadura del conducto biliar con disección, la cual produce una cirrosis biliar grave y crónica (Bomzon et al., 1984, 1985; Morgan et al., 1992). El método de la ligadura del conducto biliar ha sido utilizado para conocer el papel de la bilirrubina plasmática en las alteraciones hemodinámicas, tanto en presencia como en ausencia de cirrosis. Aún cuando los diferentes modelos se consideran similares con respecto al desarrollo de un estado circulatorio hiperdinámico, parecen existir diferencias en la fisiopatología y en el papel del NO en las alteraciones hemodinámicas. En la mayoría de los estudios utilizan arterias de conductancia, las cuales convienen para su uso en los baños de órganos convencionales, y también se han utilizado la perfusión mesentérica o arterias mesentéricas pequeñas. La utilización de arterias mesentéricas permite

investigar la función de los vasos que se han dilatado durante la cirrosis y contribuyen directamente al desarrollo de la hipertensión portal.

Se sabe que el endotelio desempeña un papel destacado en la regulación de la función vascular, y este papel lo lleva a cabo a través de la liberación de sustancias vasodilatadoras (NO, prostaciclina, factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF)) y sustancias vasoconstrictoras (endotelina, tromboxano A_2). Entre estas sustancias, el NO parece desempeñar el papel más destacado en condiciones normales y esto ocurre en todos los lechos vasculares, incluida la circulación esplácnica (Alexander B, 1998; Bauer C et al., 1997). La síntesis de NO se realiza por acción de la sintasa de NO sobre la L-arginina para producir NO y L-citrulina. Existen dos tipos de sintasa de NO: la forma constitutiva (SNOc) que regula la producción de NO en condiciones normales, y la forma inducible (SNOi) que regula la producción de NO en ciertas condiciones patológicas. Las propiedades físico-químicas del NO determinan su efecto biológico así como su sitio potencial de acción. Uno de sus mecanismos de acción vascular es la activación de la guanilato ciclasa, la cual estimula la formación de GMPc, disminuye la concentración de calcio intracelular y como consecuencia relaja el músculo liso vascular produciendo vasodilatación. El NO también contrarresta la vasoconstricción producida por factores vasoconstrictores locales y sistémicos (actividad nerviosa simpática, catecolaminas, sistema renina-angiotensina, vasopresina, endotelina). El papel del NO en la regulación del tono vascular se deriva de estudios que utilizan diferentes aproximaciones experimentales tales como ratones que carecen del gen para la SNOc, y animales en los que se inhibe la producción de NO

inyectando análogos de la L-arginina. El NO es rápidamente inactivado en los tejidos por oxidación para transformarse en nitritos/nitratos, los cuales difunden a la circulación, y la liberación total de NO puede ser estimada midiendo la concentración plasmática de ambos metabolitos. Asimismo, la capacidad del tejido para producir y liberar NO puede ser medida valorando la actividad de la SNOc y la SNOi.

Diversos estudios sugieren que el NO desempeña un papel clave en la vasodilatación que tiene lugar durante la cirrosis, ya que podría haber excesiva producción de esta sustancia, causando vasodilatación y al mismo tiempo disminución de la respuesta vasoconstrictora (Wiest R y Groszman RJ, 2002). Este papel del NO sin embargo no está claro todavía. Los estudios relacionados con respecto al papel del NO en la patogénesis de la vasodilatación, se han realizado fundamentalmente en modelos experimentales de hipertensión portal crónica (Pizcuela MP et al., 1992; Claria J et al., 1992; Iwata F et al., 1992; Lee FY et al., 1992; Lee FY et al., 1993; Castro A et al., 1993; Niederberger M et al., 1996). Asimismo, la mayoría de estas investigaciones han sido realizadas en ratas, en las que se han desarrollado tres modelos diferentes de hipertensión portal (cirrosis inducida por carbón tetraclorhídrico y fenobarbital, por estenosis de la vena porta y por ligadura del conducto biliar). Se ha observado, mediante quimioluminiscencia, que existe aumento en la síntesis de NO endotelial en arterias mesentéricas durante la hipertensión portal experimental (Wiest R et al., 1997). La principal fuente enzimática de esta hiperproducción de NO vascular es la sintasa de NO endotelial, lo cual es evidenciado por el notable aumento en su expresión

(Martin P et al., 1998, 1996; Niederberger et al., 1996) y en su actividad (Cahill P et al., 1996, 1995), así como en el aumento de la liberación endotelial de NO en respuesta al shear stress (Hori N et al., 1998). Sin embargo, el papel de cada una de las sintasas (constitutiva o inducible) implicadas en la producción de NO los estudios realizados han dado lugar a resultados discrepantes (Cahill PA, et al., 1996; Morales-Ruiz M et al., 1996; Atucha N et al., 1996). Esto puede deberse, en parte, a que el papel de cada sintasa varía en los diferentes modelos experimentales de hipertensión portal, así como a la heterogeneidad de los pacientes con insuficiencia hepática. Además, la fuente de NO puede variar en las diferentes etapas del desarrollo de la hipertensión portal, desde su inicio hasta el desarrollo completo del síndrome (Gadano AC et al., 1998).

También se ha descrito que parte de la vasodilatación que se produce durante la cirrosis estaría causada por un péptido vasodilatador dependiente del endotelio y/o por un defecto primario en las células musculares lisas de las arterias esplánicas (Heinemann A y Stauber RE, 1996; Heinemann A, et al., 1997). En relación con este último mecanismo, se ha mencionado el aumento en la expresión de ciclooxigenasa-1 en la arteria mesentérica superior y el aumento de los niveles plasmáticos de prostaciclina durante la hipertensión portal (Hou MC et al., 1998).

La célula endotelial de los sinusoides hepáticos es una célula especializada y es anatómica y biológicamente distinta de las células endoteliales vasculares, pero ambos tipos de células tienen en común el producir y liberar NO con efectos vasculares (Vane J et al., 1990). La disfunción de ambos tipos de células endoteliales podría contribuir a las alteraciones que

se producen en la circulación intra- y extrahepática durante la cirrosis. Las alteraciones hemodinámicas en la circulación intra- y extra-hepática parecen ser muy diferentes, pues se ha observado vasoconstricción y disminución en la respuesta vasodilatadora en los vasos intrahepáticos, y por el contrario vasodilatación e hiporespuesta vasoconstrictora en la circulación esplácnica (Shah V, 2001; Wiest R y Groszmann RJ, 2002). La disfunción endotelial con incremento en la respuesta vasoconstrictora en el lecho vascular intrahepático durante la cirrosis se atribuye a un aumento en la producción de tromboxano A₂ mediado por la COX-1 y no por la COX-2 (Graupera M, et al., 2003). Las condiciones que rodean los vasos intrahepáticos y extrahepáticos (espláncnicos) durante la cirrosis son diferentes, y por ello el estado del endotelio y la respuesta vascular de ambos tipos de vasos podrían cambiar de forma distinta (Shah V, 2001; Wiest R y Groszmann RJ, 2002). Las diferencias en los vasos intra- y extra-hepáticos han sido relacionadas con una alteración opuesta en la función del NO en la circulación intra y extrahepática (esplácnica) durante la cirrosis (Shah V, 2001; Wiest R y Groszmann RJ, 2002): en la circulación intrahepática habría disminución en la síntesis y/o liberación de NO, mientras que en la circulación extrahepática habría un aumento en la formación y/o liberación de NO. Tanto el aumento de la producción de NO en la circulación extrahepática (causada por la sintasa de NO inducible, o por estimulación de la sintasa de NO endotelial) como la disminución en la circulación intrahepática (por déficit intrahepático de sintasa de NO endotelial), podrían coexistir durante la cirrosis (Cahill P. et al., 2001).

Los estudios realizados para examinar el estado funcional del endotelio en los vasos esplácnicos y sistémicos de pacientes con cirrosis son escasos, y los resultados disponibles no son concluyentes (Wiest y Groszmann, 2002). El escaso conocimiento del estado funcional del endotelio de los vasos esplácnicos ha dificultado la interpretación de los resultados obtenidos en los diferentes estudios donde se ha explorado la respuesta vascular sistémica y esplácnica durante la cirrosis. En relación a esto, se ha descrito un aumento en la relajación dependiente del endotelio en los vasos del antebrazo de pacientes cirróticos (Albillos A et al., 1995) y en anillos aórticos aislados de ratas cirróticas (Claria J et al., 1994). Por otro lado, la arteria mesentérica superior de ratas con cirrosis experimental muestra disminución de la vasodilatación dependiente e independiente del endotelio, lo cual se atribuye a una alteración en la capacidad de respuesta del músculo liso vascular (Colle IO et al., 2004). Asimismo, se ha descrito una alteración en la relajación independiente del endotelio sin afectar la relajación dependiente del endotelio en la arteria mesentérica superior de ratas con cirrosis experimental (Mathie RT et al., 1996). La trombosis de la arteria hepática es una de las más serias complicaciones después del trasplante hepático. En esta complicación se han identificado factores de riesgo quirúrgico y médico, y el papel exacto del endotelio en esta complicación no está claro. Como el endotelio también actúa previniendo la adhesión y agregación plaquetaria, el daño endotelial podría favorecer el vasoespasmo y promover la formación de trombos tras el trasplante (Jeng L-BB, et al., 1996). Por tanto, parece conveniente conocer el estado funcional del endotelio, especialmente en la circulación esplácnica, para

poder interpretar adecuadamente la fisiopatología de las alteraciones circulatorias que se producen durante la cirrosis.

Recientemente se ha propuesto la hipótesis de que las especies reactivas de oxígeno podrían estar implicadas en la fisiopatología de las alteraciones vasculares durante la cirrosis (Fernando et al., 1998; Bomzon y Ljubuncic, 2001). Durante la cirrosis parece aumentar la formación de especies reactivas de nitrógeno (Wiest R y Grozmann RJ, 2002) y de especies reactivas de oxígeno (Szuster-Ciesielska A, et al., 2002; Adachi T, et al., 2005) y que estas especies pueden producir efectos deletéreos en la función vascular (Kojda G y Harrison D, 1999; Griendling KK, et al 2003). El término especies reactivas de oxígeno es referido principalmente al anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y al radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Las especies reactivas de oxígeno y las especies reactivas de nitrógeno se forman intra y extracelularmente, y existen dos categorías de sistemas de defensa antioxidante: los enzimáticos y los no enzimáticos. El sistema de defensa enzimático mejor conocido es la vía catabólica para el anión superóxido. En los vasos sanguíneos, los sistemas antioxidantes claves son la actividad de la superóxido dismutasa y de la catalasa, y una de las más importantes especies reactivas de oxígeno en los vasos sanguíneos es el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (Auch-Schwelk et al., 1989, Davidge et al., 1998, S.T., Pagano et al., 1999, Rhoades et al., 1990). El anión superóxido parece ocupar un lugar destacado y actúa directamente sobre la función vascular e indirectamente generando otras especies reactivas (Bomzon y Ljubuncic, 2001, Kojda G y Harrison D, 1999; Griendling KK, et al 2003). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una molécula

estable formada a partir del anión superóxido, en reacción espontánea o bien catalizada por la superóxido dismutasa. El H_2O_2 es degradado a agua por las enzimas catalasa o glutathion peroxidasa, y puede alterar el tono vascular ya sea induciendo vasodilatación (Barlow et al., 2000; Barlow y White, 1998; Iesaki et al., 1999; Rubanyi y Vanhoutte, 1986; Wei et al., 1996, 1998) o vasoconstricción (Rhoades et al., 1990; Rodríguez-Martínez et al., 1998b; Shen et al., 2000; Yang, Z. W. et al., 1998a) según sea el territorio vascular. Además, el H_2O_2 también puede potenciar la respuesta a estímulos vasoconstrictores (Hamilton et al., 1998; Hubel et al., 1993). La vasodilatación producida por el peróxido de hidrógeno puede ser dependiente del endotelio (Rubanyi y Vanhoutte, 1986a; Wei et al., 1996), activada por la guanilato ciclasa soluble o por el radical hidroxilo (OH^\cdot) (Burke y Wolin, 1987), y dependiente de la apertura de canales de K^+ sensibles al ATP (Wei et al., 1996, 1998) y/o al calcio (Barlow et al., 2000). El mecanismo por el cual se produce la vasoconstricción también es controvertido, y se han propuesto varios mecanismos. La contracción puede ser dependiente o independiente del endotelio (Yang et al., 1999), puede involucrar la activación de receptores para el ATP (Peláez et al., 2000; Shen et al., 2000), y puede estar mediada por el radical hidroxilo (Zang, Z. W. et al., 1998b). El peróxido de hidrógeno puede reducir la afinidad y el número de α - y β -adrenoceptores (Gazawi et al., 2000), disminuir la actividad de las proteínas G (Dai et al., 1995) y disminuir, peróxido de hidrógeno puede ser dependiente del endotelio (Rubanyi y Vanhoutte, 1986a; Wei et al., 1996), activada por la guanilato ciclasa soluble o por el radical hidroxilo (OH^\cdot) (Burke y Wolin, 1987), y dependiente de la apertura de

canales de K^+ sensibles al ATP (Wei et al., 1996, 1998) y/o al calcio (Barlow et al., 2000). El mecanismo por el cual se produce la vasoconstricción también es controvertido, y se han propuesto varios mecanismos. La contracción puede ser dependiente o independiente del endotelio (Yang et al., 1999), puede involucrar la activación de receptores para el ATP (Peláez et al., 2000; Shen et al., 2000), y puede estar mediada por el radical hidroxilo (Zang, Z. W, et al., 1998b). El peróxido de hidrógeno puede reducir la afinidad y el número de α - y β -adrenoceptores (Gazawi et al., 2000), disminuir la actividad de las proteínas G (Dai et al., 1995) y disminuir, también, la actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje así como la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico (Lounsbury et al., 2000).

El radical hidroxilo ($OH\cdot$) es altamente reactivo y se forma cuando el peróxido de hidrógeno entra en contacto con el Fe^{2+} . Debido a su corta vida media, se ha hecho difícil estudiar sus efectos en los sistemas biológicos. De hecho sus efectos vasculares se derivan de estudios en los que se valoran los efectos del anión superóxido y/o del peróxido de hidrógeno (Bauer et al., 1999; Rhoades et al., 1990; Yang, Z. W. et al., 1998b).

El peroxinitrito ($ONOO\cdot$) es una especie reactiva de nitrógeno formada por la interacción entre el anión superóxido y el NO. En los vasos sanguíneos, el peroxinitrito actúa como vasodilatador (Barlow y White, 1998; Benkuský et al., 1998; Ferenci, 1996), y esta vasodilatación está mediada por la guanilato ciclasa soluble (Ilesaki et al., 1999) y la activación de canales de K^+ sensibles al ATP (Patel et al., 1999). Además, se ha encontrado que también puede producir vasoconstricción, efecto mediado por la inhibición de canales de K^+

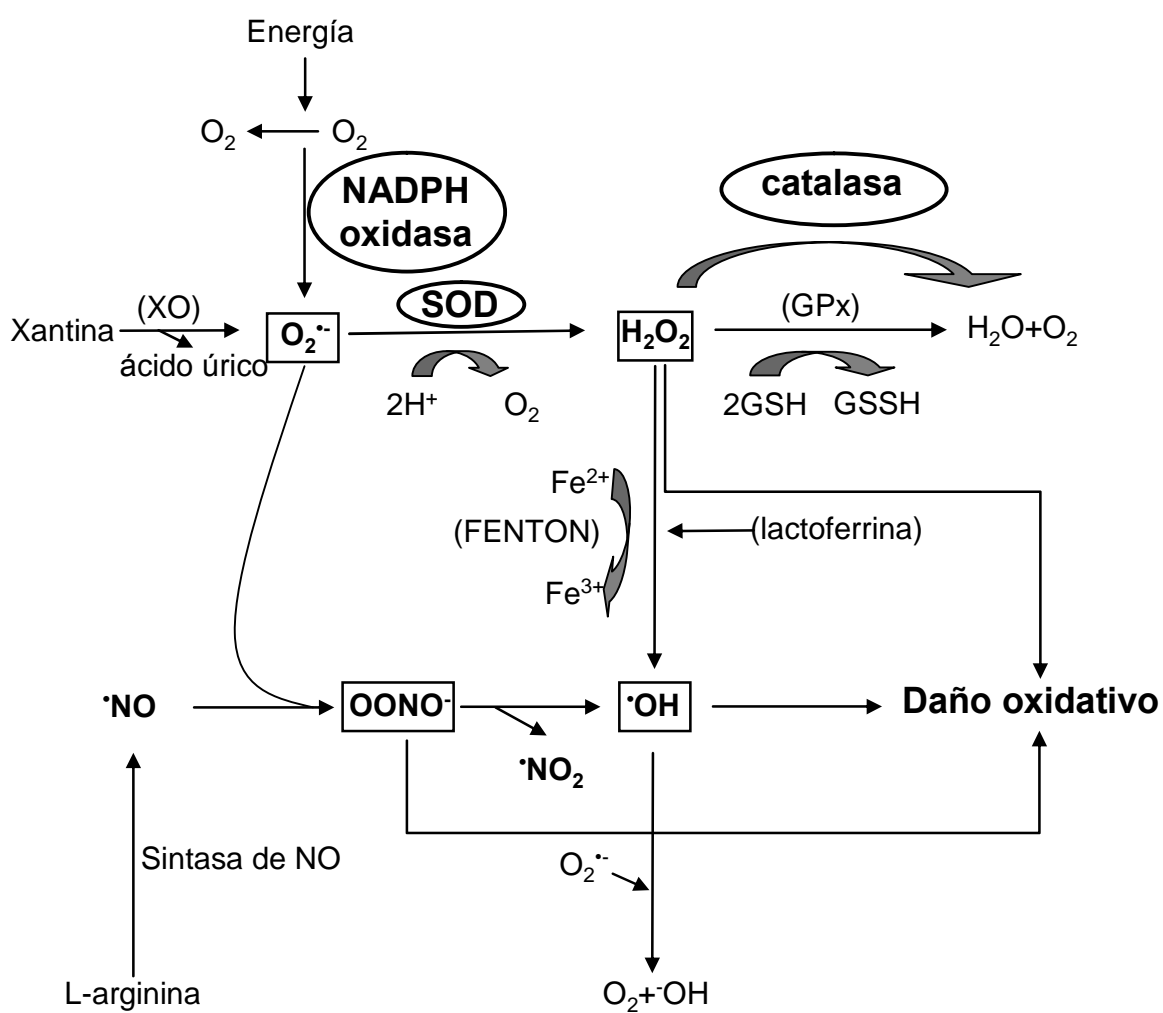


Figura 3. Esquema mostrando las principales reacciones implicadas en la formación de especies reactivas de oxígeno.

dependientes de calcio (Elliott et al., 1998). La Figura 3 muestra un esquema indicando las principales reacciones implicadas en la formación de especies reactivas de oxígeno.

La enfermedad hepática esta asociada con estrés oxidativo (Rosser y Gores, 1995) y con aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (Bomzon A and Ljubuncic P, 2001), cuya fuente de producción puede ser intrahepática y extrahepática (Bomzon A and Ljubuncic P, 2001). A nivel intrahepático la formación de las especies reactivas de oxígeno parece implicar al agente etiológico responsable de la enfermedad hepática (virus, bacterias, toxinas, drogas, retención de sustancias endógenas) y la fuente extrahepática implica la activación crónica del sistema nervioso simpático, reflejado por un aumento en la concentración plasmática de catecolaminas (Henriksen et al., 1985). Las catecolaminas estimulan la producción de especies reactivas de oxígeno (Singal et al., 1982, 1983). Muchas de las funciones del endotelio son afectadas por las especies reactivas del oxígeno.

La función más afectada parece ser la vasodilatación dependiente del endotelio, la cual se altera debido a que disminuye la producción y/o la biodisponibilidad de las sustancias vasodilatadoras derivadas del endotelio, en particular el NO (Hua C y Harrison DG, 2000). Asimismo, estas especies causan apoptosis de las células endoteliales y aumento de la adhesión de monocitos (Griendling KK, et al., 2000). En modelos animales, el aumento de especies reactivas de oxígeno se asocia a disfunción endotelial debido a la inactivación del NO por el O_2^{\bullet} (Huang Y.T et al., 2003; Bomzon y Ljubuncic 2001). Por otro lado, se ha observado que el aporte de superóxido dismutasa

mejora la vasodilatación dependiente del endotelio en animales hipercolesterolémicos (Mugge A, et al., 1991). Asimismo, muchas de las funciones de las células musculares lisas de los vasos sanguíneos también dependen de la producción de especies reactivas de oxígeno, ya que estas especies participan en la expresión de mediadores inflamatorios y componentes de la matriz extracelular (Taniyama Y Griendling KK, 2003). El papel de las especies reactivas en las alteraciones vasculares producidas durante la cirrosis no ha sido examinado.

La apelina, aislada en 1998 en el estómago de bóvidos (Tatemoto et al., 1998), está constituida por una familia de péptidos de los cuales hay formas largas (apelina 36) y formas cortas (apelinas 17, 13, 12) (Matos et al., 2000; Ashley et al., 2006), que actúan como ligandos endógenos de un receptor anteriormente huérfano denominado receptor APJ, también llamado angiotensin receptor-like 1 (ATL1) (Ashley et al., 2006). Este receptor está acoplado a proteínas G, y está presente en los cardiomiocitos, en las células de músculo liso vascular y en el endotelio. La apelina y sus receptores se expresan en el tubo digestivo y en el sistema cardiovascular (miocardio y vasos sanguíneos) (Ashley et al., 2006, Kleinz et al., 2003, Katugampola et al., 2001). En condiciones normales la apelina está presente en el plasma y se mantiene en concentraciones estables, en un rango que tiene efectos fisiológicos (Ashley 2006). El papel fisiológico de la apelina no se conoce aún, y varios estudios sugieren que puede desempeñar una función relevante en la regulación gastrointestinal (Wang G. et al., 2004), en la homeostasis de los líquidos corporales (Taheri et al., 2002; Reaux et al., 2001) y en la regulación

cardiovascular (Tatemoto 2001, Seyedabadi 2002, Szokodi 2002, Katugampola 2001). Los sitios de acción de la apelina-13 se han localizado usando autoradiografías de arterias coronarias humanas, aorta y en injertos de la vena safena (Katugampola 2001). Los estudios realizados en ratas anestesiadas han demostrado que la inyección intravenosa de apelina disminuye la presión arterial sistémica (Lee 2000, Kagiya 2004), y utilizando ratas despiertas se demostró que la apelina puede actuar como dilatador venoso y arterial (Ashley 2006). Asimismo, se ha descrito que los efectos hemodinámicos de la apelina desaparecen tras el tratamiento con un inhibidor de la síntesis de NO, lo cual sugiere que este péptido disminuye la presión arterial a través de un mecanismo dependiente de NO (Tatemoto 2001). La inyección intracerebroventricular de apelina no modifica la presión arterial en ratas anestesiadas (Reaux 2001), pero cuando esto se realiza en ratas despiertas la apelina aumenta la presión arterial (Kagiya 2004). El conocimiento de los efectos de la apelina en los vasos humanos es muy pobre. Un estudio in vitro, realizado en vena safena humana sin endotelio, demostró que la apelina produce vasoconstricción (Katugampola 2001). Por todo ello, y aprovechando la oportunidad de disponer de arterias humanas, consideramos de interés estudiar los efectos de la apelina en las arterias esplánicas normales y en las procedentes de pacientes con cirrosis. Este estudio podría contribuir a conocer el papel de la apelina en la regulación de la circulación esplánica y en la fisiopatología de las alteraciones vasculares durante la cirrosis.

OBJETIVOS

Los pacientes con cirrosis en estado avanzado presentan un estado circulatorio hiperdinámico, pero aún no se conocen los mecanismos implicados en esta alteración, y los estudios dirigidos a conocer el estado funcional del endotelio son incompletos. Por otro lado, durante la cirrosis parece estar aumentada la producción de especies reactivas de oxígeno, las cuales podrían intervenir en la fisiopatología de esas alteraciones cardiovasculares.

Nuestra hipótesis es que durante la cirrosis se altera la función del endotelio vascular, y que esta alteración podría estar causada, al menos en parte, por el aumento de especies reactivas de oxígeno.

Para demostrar esta hipótesis, en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

1) Estudiar el estado funcional del endotelio de las arterias esplánicas de pacientes con insuficiencia hepática terminal. Para ello, se examinó la relajación arterial dependiente del endotelio con acetilcolina, e independiente del endotelio con nitroprusiato sódico.

2) Estudiar el papel de las especies reactivas del oxígeno en la posible alteración funcional del endotelio de dichas arterias. Para ello se examinó la relajación arterial dependiente de endotelio en ausencia y en presencia de sustancias que inhiben la producción o aumentan la eliminación de algunas especies reactivas de oxígeno.

3) Estudiar el efecto de la apelina en dichas arterias, analizando el papel del NO y de los prostanoïdes en este efecto.

Este estudio se hizo utilizando arterias hepáticas de pacientes cirróticos sometidos a transplante hepático, y determinando la respuesta vascular in vitro a la acetilcolina y al nitroprusiato sódico. Esto se llevó a cabo en arterias en ausencia y en presencia de Nω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, inhibidor de la síntesis de óxido nítrico); meclofenamato (inhibidor de la ciclooxigenasa); catalasa (catalizador de la degradación de peróxido de hidrógeno); tiron (mimético de la superóxido dismutasa); dietilditiocarbamato (DETCA, inhibidor de la superóxido dismutasa); cloruro de difenileneiodonium (DPI, inhibidor de la enzima NADPH oxidasa); la combinación de catalasa más L-NAME, y la combinación de tiron más L-NAME; la combinación de meclofenamato más L-NAME; la combinación de los inhibidores de los canales de potasio dependientes de calcio, apamina más caribdotoxina; o la combinación de L-NAME, meclofenamato, apamina y caribdotoxina. Además, se analizó el efecto de la apelina, en ausencia y en presencia de L-NAME o meclofenamato.

Los resultados obtenidos en las arterias hepáticas de los pacientes cirróticos se comparan con los obtenidos en las arterias mesentéricas (esplácnicas) de los correspondientes donantes del hígado. Se han utilizado arterias mesentéricas de los donantes en lugar de arterias hepáticas debido a que estas últimas no estaban disponibles para el presente estudio, ya que eran utilizadas durante el procedimiento del transplante. No obstante, existen datos indicando que arterias hepáticas y arterias mesentéricas normales de rata muestran una respuesta similar a la acetilcolina (Zygmunt PM, et al., 1995; Chauhan S, et al., 2003). Asimismo, la respuesta adrenérgica es similar en las arterias hepáticas y mesentéricas humanas (Hadoke et al., 1995).

Con ello se pretende aportar bases experimentales para contribuir al conocimiento de la fisiopatología de las alteraciones vasculares que tienen lugar en los pacientes con cirrosis hepática, y de esta manera diseñar tratamientos eficaces para aliviar a los pacientes que sufran esta enfermedad.

.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Los estudios se realizaron utilizando las ramas derecha e izquierda de la arteria hepática del hígado previamente extraído de 33 pacientes en el estadio final de su insuficiencia hepática y sometidos a transplante hepático (edad media 51 años; rango: 33-68; 27 hombres y 6 mujeres). La etiología de la cirrosis fue relacionada con alcohol en 9 pacientes, con virus de hepatitis en 15 pacientes (en 3 virus B, y en 12 virus C); con alcohol y virus C en 4 pacientes; criptogénica en 3 pacientes y 2 paciente con cirrosis biliar primaria. Del total, 10 pacientes presentaban también hepatocarcinoma. Seis pacientes fueron clasificados como Child-Pugh A, quince pacientes como Child-Pugh B y doce pacientes como Child-Pugh C (Farreras V, 2004). El diagnóstico de cirrosis se realizó mediante biopsia de tejido hepático en todos los pacientes, complementada con serología, bioquímica sanguínea, ecografía abdominal y ecografía doppler. Todos los pacientes presentaban hipotensión arterial sistémica e hipertensión portal evidenciada por la presencia de varices esofágicas mediante endoscopia. Once pacientes presentaron episodios de hemorragia digestiva alta, catorce pacientes tenían ascitis, cuatro pacientes habían presentado un episodio de peritonitis bacteriana espontánea, y cuatro pacientes presentaron un episodio de encefalopatía hepática.

Seis de estos pacientes tenían historia de hipertensión arterial, cuatro de diabetes mellitus tipo II, diecinueve eran fumadores (5-40 cigarrillos/día) y seis presentaban hipercolesterolemia (204-273 mg/dl). Asimismo, un paciente estaba recibiendo tratamiento con propanolol, dos con noradrenalina, uno con

dobutamina y uno con noradrenalina más dobutamina en los días previos al trasplante hepático.

Como controles se utilizaron ramas de la arteria mesentérica superior extraídas de 26 donantes del hígado (edad media 40 años, rango: 18-68; 15 hombres y 11 mujeres). La causa de muerte de estos donantes fue accidente cerebrovascular en 15 casos, y traumatismo craneoencefálico en 11. Siete donantes habían sido diagnosticados previamente de hipertensión arterial, seis presentaban hipercolesterolemia (218-345 mg/dl) y nueve eran fumadores crónicos (5-20 cigarrillos/día).

La Tabla 1 resume las características clínicas de los pacientes receptores de hígado y de los donantes de hígado.

Procedimiento experimental

En el presente estudio, una vez extraído el hígado del paciente cirrótico durante el trasplante, se recogieron las ramas derecha e izquierda de la arteria hepática, situadas dentro del hilio hepático. Asimismo, se tomaron ramas del tercer arco de la arteria mesentérica superior, las cuales fueron obtenidas a partir de los tejidos que habían sido previamente extirpados del donante. La Figura 4 muestra la anatomía de las ramas del tronco celíaco y de la arteria mesentérica superior. La Figura 5 es una fotografía de las arterias hepáticas y arterias mesentéricas obtenidas en uno de los casos estudiados.

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes receptores y donantes de hígado

Características	Receptores	Donantes
Nº de pacientes	33	26
Edad media; (rango)	51; (33-68)	40; (18-68)
Sexo (M:F)	27:6	15:11
Etiología de la cirrosis		
Virus (C o B)	15	-
Alcohol	9	-
Alcohol y virus	4	-
Criptogénica	3	-
Biliar primaria	2	-
Hepatocarcinoma	10	-
Puntuación Child-Pugh	8.31±0.57 (5-12)	-
Clase Child-Pugh	A (n=6)	-
	B (n=15)	-
	C (n=12)	-
Complicaciones de la cirrosis		
- Varices esofágicas	14	-
- Hemorragia digestiva alta	11	-
- Ascitis	14	-
- Peritonitis bacteriana espontánea	4	-
- Encefalopatía hepática	4	-
Factores de riesgo cardiovascular		
- Hipertensión arterial	6	7
- Hiperlipidemia (colesterol total >200mg)	6	6
- Diabéticos	4	0
- Fumadores	19	9
- Sobrepeso (IMC>25)	13	11

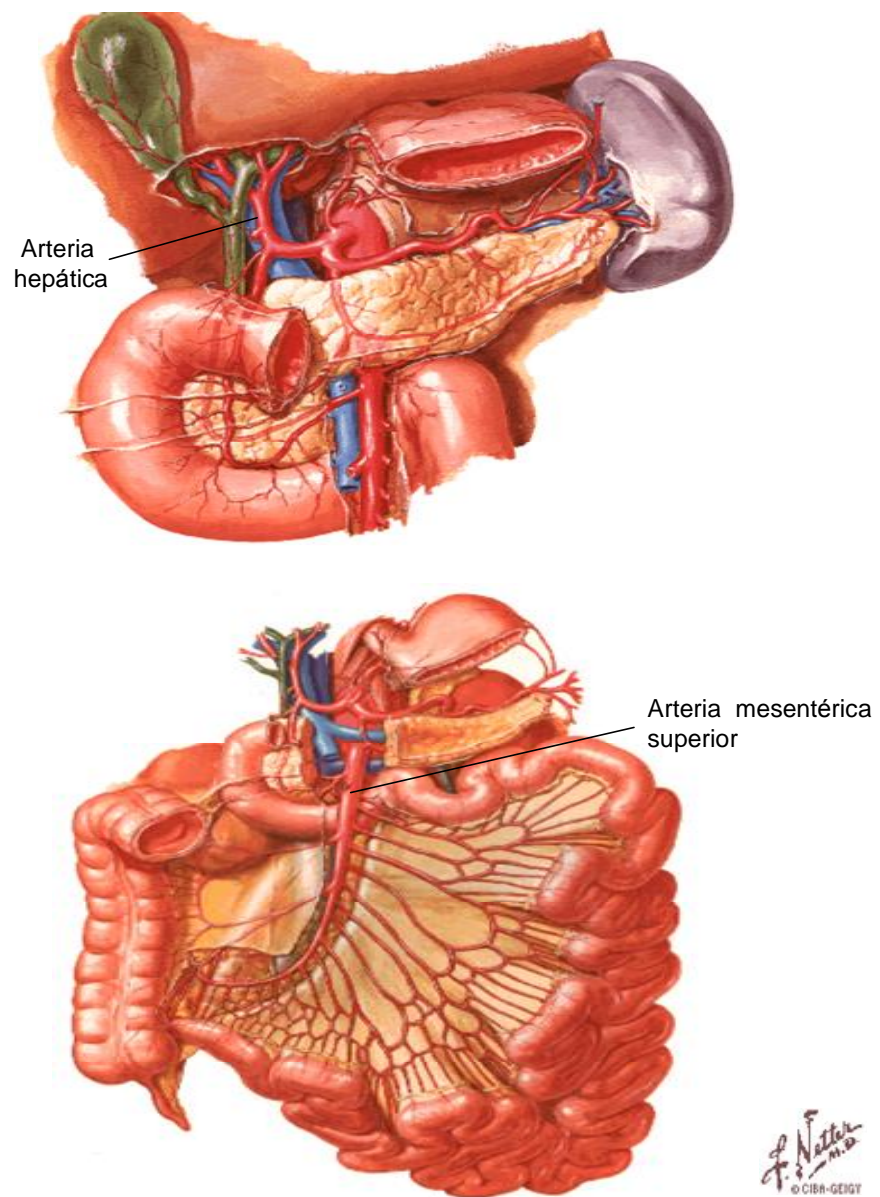


Figura 4. Arterias hepática y mesentérica superior humanas.



5 mm



Figura 5. Fotografía de la arteria hepática y sus ramas distales de un paciente sometido a transplante hepático (arriba) y de las ramas del tercer arco de la arteria mesentérica superior de un donante de hígado (abajo).

Una vez recogidas las muestras de arterias, se colocaban en un recipiente con una solución de conservación de órganos para transplante, CELSIOR® (IMTX SANGSTAT, Lyon, France) e inmediatamente eran transportadas del hospital al laboratorio. Desde que se extraían hasta que llegaban al laboratorio transcurrían de 6 -10 horas.

Una vez en el laboratorio, se sustituía la solución de conservación por suero salino frío. Para su disección, las arterias se depositaban en una placa de Petri con suero salino sobre hielo, y con la ayuda de una lente binocular Zeiss Stemi SR se dejaban libres de tejido conectivo y se cortaban en segmentos cilíndricos de 3 mm de longitud. En este proceso transcurrían ~ 2 horas. El diámetro externo de los segmentos arteriales hepáticos y mesentéricos era de 3-4 mm. Posteriormente estos segmentos se montaban en baños de órganos aislados, para el registro de la tensión isométrica. La preparación experimental consistía en introducir a través de la luz del cilindro vascular dos alambres finos y rígidos de acero inoxidable de 150 μ m de diámetro cada uno. Uno de los alambres está unido a un soporte, y el otro alambre, que es móvil y se desplaza paralelamente al anterior, se conecta a un transductor de fuerza (Universal transducing Cell UC3, Statham microscale accesoria UL5). Un tornillo micrométrico, conectado al alambre móvil, permitía desplazar este alambre verticalmente en sentido perpendicular al eje mayor del segmento arterial y aplicar la tensión pasiva deseada a la pared arterial. El registro de la tensión se realizaba en un ordenador Macintosh, mediante un sistema de adquisición de datos Maclab 8/e (ADInstruments) con el programa Chart v 3.4/s.

Cada segmento vascular, con los alambres introducidos en su luz, se colocaba en un baño de órganos que contenía 4 ml de solución de Krebs-Henseleit, cuya composición es la siguiente: NaCl, 115 mM; KCl, 4.6 mM; KH_2PO_4 , 1.2 mM; MgSO_4 , 1.2 mM; CaCl_2 , 2.5 mM; NaHCO_3 , 25 mM y glucosa, 11.1 mM. Esta solución se equilibraba con una mezcla gaseosa (95% de oxígeno y 5% de dióxido de carbono) para proporcionarle un pH de 7.3-7.4 que se verificaba con un pH-metro de laboratorio, modelo 2001 de Crison. Un circuito de agua caliente que rodea al baño permitía mantener la solución de Krebs-Henseleit junto con los segmentos vasculares a una temperatura de $37 \pm 0,5$ °C; la temperatura se ajustaba al valor deseado antes de introducir las arterias en el baño de órganos y se mantenía constante durante la realización de los experimentos.

La Figura 6 muestra una representación esquemática del montaje experimental utilizado para el registro de la tensión isométrica.

Los experimentos se realizaron en las arterias sometidas a una tensión pasiva de 2 g, la cual se aplicaba a los segmentos vasculares distendiendo repetidamente la pared mediante el tornillo micrométrico durante un periodo de 2 – 2.5 horas, hasta que la tensión se equilibraba en el valor deseado (2 g). Esta tensión pasiva se consideró óptima basada en estudios previos de nuestro laboratorio.

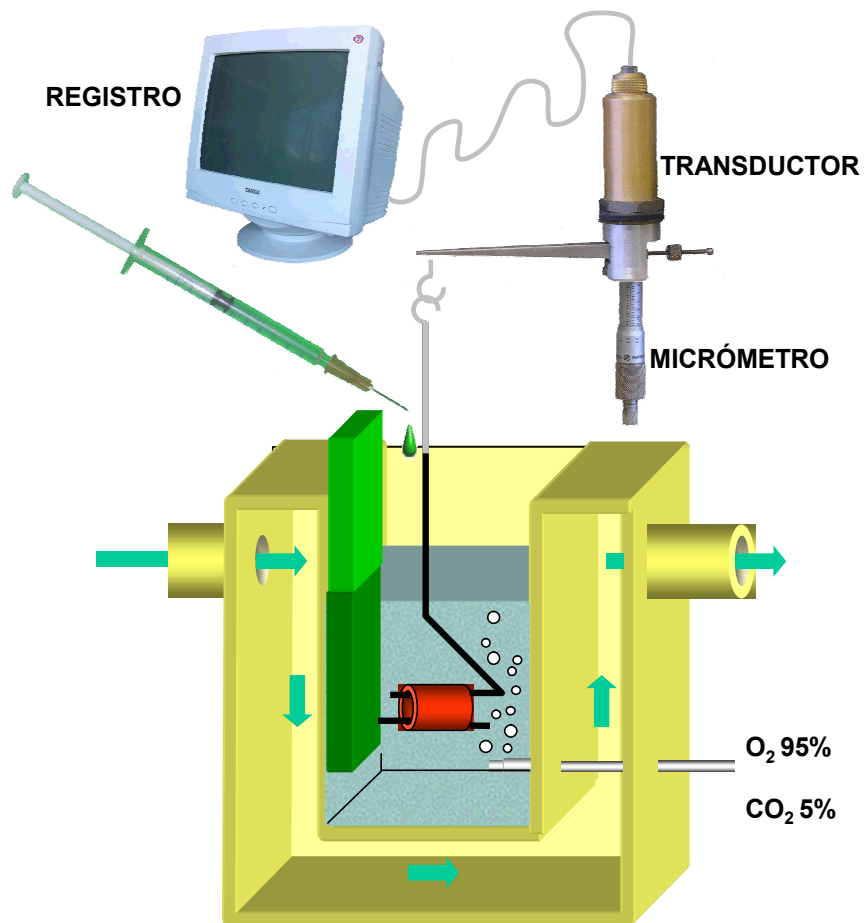


Figura 6. Representación esquemática del montaje experimental utilizado para el registro de la tensión isométrica en los vasos sanguíneos.

Protocolo experimental

En primer lugar se probaba la capacidad funcional del músculo liso arterial valorando el efecto contráctil del cloruro potásico (100 mM). Esto se realizó antes de aplicar ningún tratamiento. Tras esta prueba se realizaron varios lavados hasta que se recuperaba la tensión pasiva. Posteriormente se registraron las curvas concentración-respuesta para la acetilcolina (10^{-8} a 10^{-4} M) y nitroprusiato sódico (10^{-8} a 10^{-4} M), con el fin de estudiar el estado funcional del endotelio y la capacidad relajadora. Esto se realizó en las arterias con tono activo previamente inducido con el análogo del tromboxano A_2 U46619 (10^{-9} a 10^{-7} M) en las siguientes condiciones: arterias no tratadas (control) y arterias tratadas con el inhibidor de la síntesis de NO N ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 10^{-4} M), o con el inhibidor de la ciclooxigenasa meclofenamato (10^{-5} M).

Para estudiar el papel de los canales de potasio dependientes de calcio, se realizaron las curvas dosis-respuesta para la acetilcolina en arterias no tratadas (control) y en arterias tratadas con la combinación de L-NAME (10^{-4} M) más meclofenamato (10^{-5} M); con la combinación de los inhibidores de los canales de potasio dependientes de calcio apamina (10^{-6} M) más caribdotoxina (10^{-7} M); o con la combinación de L-NAME, (10^{-4} M) más meclofenamato (10^{-5} M) más apamina (10^{-6} M) más caribdotoxina (10^{-7} M).

Para estudiar el papel de los especies reactivas de oxígeno en la respuesta vascular, también se registraron los efectos de la acetilcolina en arterias no tratadas (control) y en arterias tratadas con el catalizador de la

degradación del peróxido de hidrógeno catalasa (1000 U/ml); con el mimético de la superóxido dismutasa tiron (10^{-2} M); con el inhibidor de la superóxido dismutasa dietilditiocarbamato sódico trihidrato (DETCA, 10^{-3} M); con el inhibidor de la enzima NADPH oxidasa cloruro de difenileneiodonium (DPI, 5×10^{-6} M); con la combinación de catalasa (1000 U/ml) más L-NAME (10^{-4} M) y con la combinación tiron (10^{-2} M) más L-NAME (10^{-4} M). Este tipo de estudios no se realizó con nitroprusiato sódico porque los efectos de esta sustancia en las arterias hepáticas no estaban alterados.

En las arterias hepáticas y mesentéricas para examinar el efecto de la apelina (10^{-10} a 10^{-6} M) se realizaron curvas dosis-respuesta para este péptido, en condiciones de reposo y también en las arterias previamente contraídas con el análogo del tromboxano A_2 U46619 (10^{-9} a 10^{-7} M), no tratadas y tratadas con L-NAME, (10^{-4} M) o meclofenamato (10^{-5} M).

En cada segmento arterial se obtenían dos curvas concentración-respuesta para dos de los agonistas utilizados (acetilcolina y nitroprusiato sódico). Una vez realizada la curva dosis-respuesta con uno de los agonistas, el segmento arterial era repetidamente lavado durante 60-90 minutos antes de registrar el efecto del siguiente agonista. Para la apelina se realizó una curva en cada segmento arterial.

Según cada caso, el L-NAME, meclofenamato, apamina o caribdotoxina (y sus respectivas combinaciones) se aplicaron al baño de órganos 30-35 minutos antes de registrar los efectos de los agonistas. La catalasa se aplicó al baño de órganos una hora antes, y el tiron, DETCA ó DPI se aplicaron 30 -35 minutos antes de registrar la respuesta vascular.

El final de cada experimento se volvía a registrar los efectos del KCl (100mM) para valorar el estado funcional de las arterias tras el periodo de experimentación.

La relajación a la acetilcolina, al nitroprusiato sódico y a la apelina se expresa como el porcentaje del tono alcanzado con el U46619. Con estos datos se realizaron las gráficas que muestran las curvas concentración-respuesta. La pD_2 (sensibilidad vascular) para cada curva concentración-respuesta fue calculada como el logaritmo negativo de la concentración que produce el 50% del efecto máximo mediante interpolación geométrica.

Análisis estadístico de los resultados

Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de la media . La contracción producida por el cloruro potásico (KCl) y el análogo del tromboxano A_2 se expresa en valores absolutos, y la relajación producida por la acetilcolina, nitroprusiato sódico o apelina es expresada como porcentaje del tono alcanzado con el U46619. La comparación estadística de los resultados obtenidos en los dos tipos de arterias (arterias hepáticas y mesentéricas) no tratadas se realizó utilizando el test de la t de Student para datos no pareados. Los efectos de los diferentes tratamientos en la relajación frente a la acetilcolina, nitroprusiato sódico o apelina en cada tipo de arterias fueron evaluados aplicando el ANOVA factorial de una vía seguido del test de Dunnett.

Además, se aplicó el ANOVA factorial de dos vías seguido del test de Bonferroni para analizar si los efectos de los tratamientos usados eran diferentes en las arterias hepáticas y las arterias mesentéricas. En cada caso, $P < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Sustancias utilizadas

Las soluciones de cada fármaco, preparadas inmediatamente antes de cada experimento, se hacían en suero salino fisiológico con 0,01% de ácido ascórbico para evitar la oxidación del fármaco. En ningún caso el volumen total añadido al baño de órganos fue superior al 10% del volumen inicial del mismo. Las concentraciones se expresan en moles por litro (M) y representan la concentración final en el baño.

Los productos usados en el presente trabajo y la procedencia de cada uno de ellos se enumeran a continuación:

De los laboratorios SIGMA se obtuvo:

- Clorhidrato de acetilcolina (Acetilcolina).
- Nitroprusiato sódico.
- Apelina-13
- 9,11-Dideoxy-11 α , 9 α -epoxymetano prostaglandina $F_{2\alpha}$ (U46619).
- N ω - nitro-L- arginina metil éster (L-NAME).

- 2 [1,6-Dicloro-3-metilfenil-amino] sal del ácido benzoico (Meclofenamato).
- Catalasa.
- 4,5-Dihydroxido-1,3- sal del ácido benceno disulfónico disódico (Tiron).
- Dietilditiocarbamato sódico trihidratado (DETCA).
- Cloruro de difenileneiodonium (DPI).
- Apamina.
- Charibdotoxina.

De los laboratorios MERCK se obtuvo el cloruro potásico (KCl).

RESULTADOS

En los segmentos arteriales no tratados, el cloruro potásico (100 mM) produjo contracción, y ésta fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en las arterias hepáticas (5624 ± 359 mg., 93 segmentos de 33 pacientes cirróticos) que en las arterias mesentéricas (4521 ± 416 mg., 65 segmentos de 26 pacientes donantes) (Figura 7). El efecto contráctil del KCl no fue modificado por ninguno de los tratamientos utilizados. Al final de los experimentos, la respuesta al KCl en ambos tipos de arterias no fue significativamente distinta a la respuesta obtenida al comienzo de los experimentos.

El tono alcanzado con el análogo del tromboxano A_2 U46619 no fue significativamente diferente ($P > 0.05$) en las arterias hepáticas (4086 ± 370 mg., 97 segmentos de 33 pacientes cirróticos) y en las arterias mesentéricas (3313 ± 378 mg., 65 segmentos de 26 donantes). Asimismo, el tono inducido por el análogo del tromboxano A_2 U46619 no fue modificado significativamente por los diferentes tratamientos (Tablas 2 y 3).

La acetilcolina (10^{-8} - 10^{-4} M) produjo relajación arterial cuya magnitud dependía de la concentración. Sin embargo, esta relajación fue significativamente menor en las arterias hepáticas (49 segmentos de 24 pacientes cirróticos) que en las arterias mesentéricas (34 segmentos de 17 donantes) (Figura 8). La sensibilidad (pD_2) a esta sustancia fue similar en ambos tipos de arterias.

El nitroprusiato sódico (10^{-8} - 10^{-4} M) también produjo una relajación que dependía de la concentración; en este caso la relajación y la sensibilidad (pD_2) fueron similares en las arterias hepáticas (16 segmentos de 6 pacientes) y en las arterias mesentéricas (11 segmentos de 5 donantes) (Figura 8).

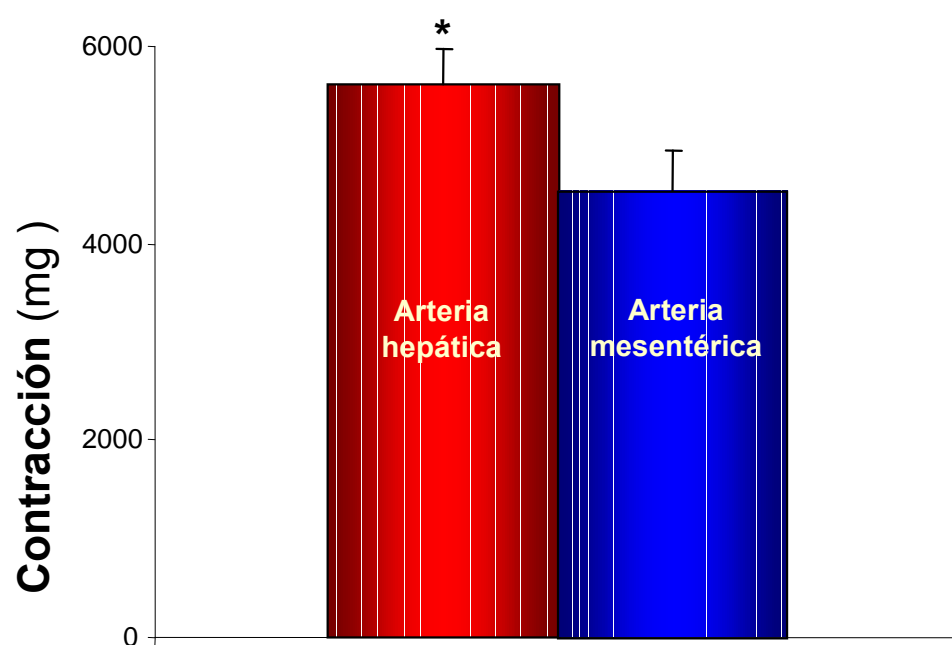


Figura 7. Contracción producida por el cloruro potásico (100mM) en las arterias no tratadas, hepáticas (93 segmentos de 33 pacientes, rojo) y mesentéricas (65 segmentos de 26 pacientes, azul). * $P < 0.05$.

Tabla 2. Tono inducido por el análogo del tromboxano A₂ U-46619 (10⁻⁷ a 10⁻⁹M) en las arterias hepáticas y en las arterias mesentéricas expuestas a la **acetilcolina** en las diferentes condiciones.

	Arterias hepáticas		Arterias mesentéricas	
	n	Tono (mg)	n	Tono (mg)
No tratadas	49	4091±445	34	3562±391
L-NAME (10 ⁻⁴ M)	13	4422±696	8	3354±705
Meclofenamato (10 ⁻⁵ M)	10	4910±930	7	3624±1193
L-NAME (10 ⁻⁴ M) + meclofenamato (10 ⁻⁵ M)	13	3358±866	13	3747±1782
Apamina (10 ⁻⁶ M) + Caribdotoxina (10 ⁻⁷ M)	8	4791±1467	8	5509±1777
L-NAME (10 ⁻⁴ M) + meclofenamato (10 ⁻⁵ M) + Apamina (10 ⁻⁶ M) + Caribdotoxina (10 ⁻⁷ M)	8	7259±1860	13	6450±1280
Catalasa (1000U/ml)	11	3262±538	9	2588±555
Tiron (10 ⁻² M)	6	2695±1130	7	2504±545
DETCA (10 ⁻³ M)	10	2864±604	7	3314±1046
DPI (5x10 ⁻⁶ M)	8	5813±1005	10	5418±764
Catalasa (1000U/ml) + L-NAME (10 ⁻⁴ M)	8	4298±919	7	4903±1043
Tiron (10 ⁻² M) + L-NAME (10 ⁻⁴ M)	9	3368±707	8	5339±793

n: número de segmentos

Tabla 3. Tono inducido por el analogo del tromboxano A_2 U-46619 (10^{-7} - 10^{-9} M) en las arterias hepáticas y en las arterias mesentéricas expuestas a **nitroprusiato sódico** y **apelina** en las diferentes condiciones.

	<u>Arterias hepáticas</u>		<u>Arterias mesentéricas</u>	
<u>Nitroprusiato sódico</u>	n	Tono (mg)	n	Tono (mg)
No tratadas	16	4801±911	11	4668±680
L-NAME (10^{-4} M)	11	4983±1185	6	4167±1014
Meclofenamato (10^{-5} M)	7	4726±1802	6	4846±350
 <u>Apelina</u>				
No tratadas	25	3954±466	14	2960±249
L-NAME (10^{-4} M)	12	2752±618	9	3659±209
Meclofenamato(10^{-5} M)	13	3355±684	6	3250±475

n: número de segmentos

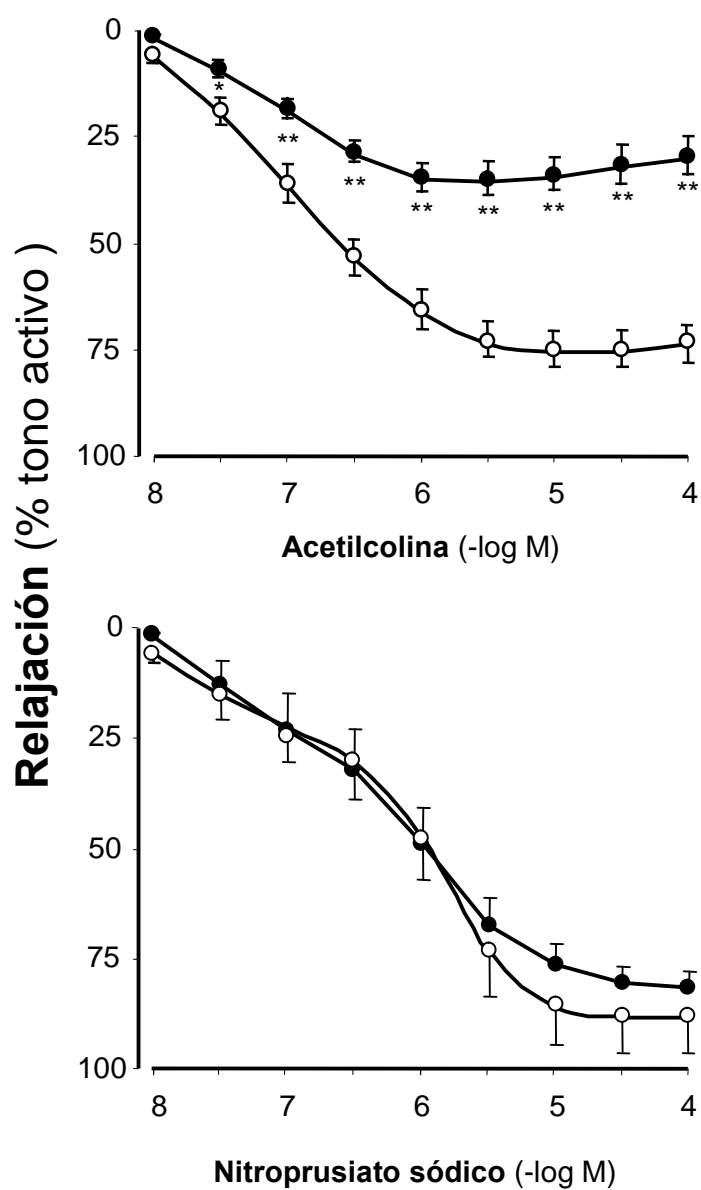


Figura 8. Resumen de la respuesta relajadora a la acetilcolina y al nitroprusiato sódico obtenida en las arterias hepáticas (●) y en las arterias mesentéricas (○). *P<0.05; **P<0.01.

El L-NAME (10^{-4} M) inhibió la relajación a la acetilcolina en las arterias mesentéricas (8 segmentos de 4 donantes) y no la afectó en las arterias hepáticas (13 segmentos de 8 pacientes). La sensibilidad (pD_2) para la acetilcolina en presencia de L-NAME estaba disminuida ($P < 0.0001$) en las arterias mesentéricas y no estaba alterada ($P > 0.05$) en las arterias hepáticas. La diferencia en la relajación a la acetilcolina entre las arterias mesentéricas no tratadas y tratadas con el L-NAME fue significativamente mayor ($P < 0.05$) que la encontrada entre las arterias hepáticas no tratadas y tratadas con el L-NAME. La relajación y sensibilidad (pD_2) al nitroprusiato sódico en las arterias hepáticas (11 segmentos de 6 pacientes) y las arterias mesentéricas (6 segmentos de 3 donantes) no fueron afectadas por el L-NAME (10^{-4} M) (Figura 9).

El meclofenamato (10^{-5} M) inhibió la relajación a la acetilcolina en las arterias mesentéricas (7 segmentos de 4 pacientes) sin modificarla en las arterias hepáticas (10 segmentos de 6 pacientes). La sensibilidad (pD_2) a la acetilcolina en presencia de meclofenamato no fue modificada en las arterias hepáticas ni en las mesentéricas (Figura 9). La diferencia en la relajación al nitroprusiato sódico entre arterias mesentéricas no tratadas y tratadas con el meclofenamato, así como entre las arterias hepáticas no tratadas y tratadas con meclofenamato no fue significativamente diferente ($P > 0.05$).

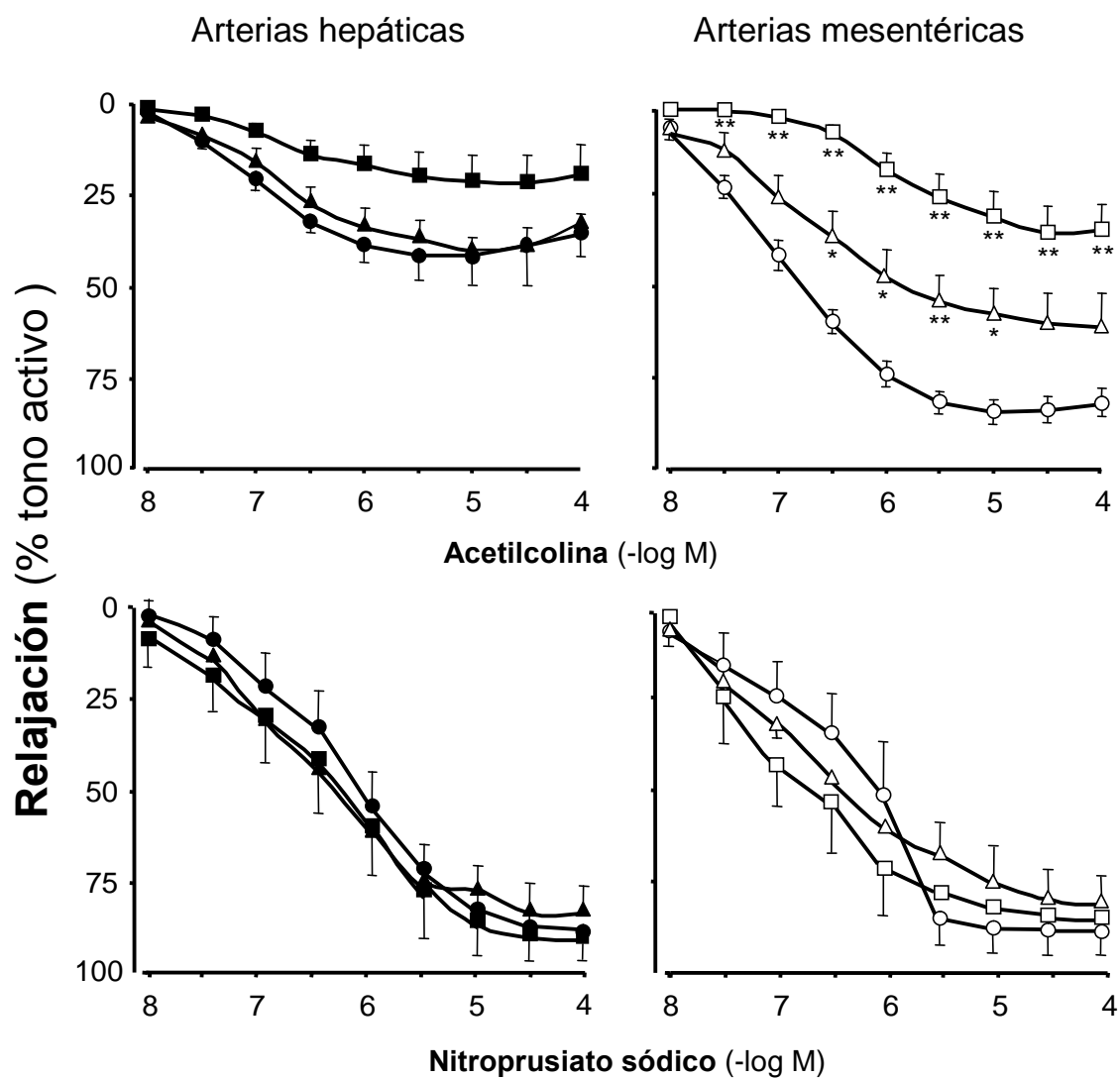


Figura 9. Resumen de la respuesta relajadora a la acetilcolina y nitroprusiato sódico obtenida en las arterias hepáticas (izquierda) y las arterias mesentéricas (derecha): arterias sin tratamiento (●, ○); arterias tratadas con L-NAME (■, □) y arterias tratadas con meclofenamato (▲, △). *P<0.05; **P<0.01, comparadas con las no tratadas.

La relajación a la acetilcolina en las arterias hepáticas en presencia de la combinación de L-NAME (10^{-4} M) más meclofenamato (10^{-5} M) (13 segmentos de 7 pacientes) o la combinación de apamina (10^{-6} M) más caribdotoxina (10^{-7} M) (8 segmentos de 4 pacientes) no fue modificada significativamente, mientras que en las arterias mesentéricas (13 segmentos de 7 pacientes, y 8 segmentos de 4 pacientes, respectivamente) fue significativamente menor que en las no tratadas. (Figura 10). La sensibilidad (pD_2) a la acetilcolina en presencia de la combinación de L-NAME más meclofenamato, o apamina más caribdotoxina no fue modificada en las arterias hepáticas ni en las mesentéricas

El efecto relajador de la acetilcolina tanto en las arterias hepáticas (8 segmentos de 7 pacientes) como en las arterias mesentéricas (13 segmentos de 7 pacientes) tratadas con la combinación de L-NAME (10^{-4} M) más meclofenamato (10^{-5} M) más apamina (10^{-6} M) más caribdotoxina (10^{-7} M) fue significativamente menor que en las no tratadas (Figura 10). La sensibilidad (pD_2) a la acetilcolina en presencia de la combinación de L-NAME más meclofenamato más apamina más caribdotoxina no fue modificada en ambos tipos de arterias.

La catalasa (1000 U/ml, 11 arterias hepáticas de 6 pacientes, y 9 arterias mesentéricas de 5 donantes) o el tiron (10^{-2} M, 6 arterias hepáticas de 3 pacientes, y 7 arterias mesentéricas de 4 donantes) incrementó la relajación a la acetilcolina en las arterias hepáticas pero no la alteró en las arterias mesentéricas. La sensibilidad (pD_2) a la acetilcolina en presencia de catalasa o tiron no fue modificada en ambos tipos de arterias. En presencia de catalasa o

tiron, la relajación y la sensibilidad a la acetilcolina en las arterias hepáticas fue similar a la encontrada en las arterias mesentéricas no tratadas. La diferencia en la relajación a la acetilcolina entre las arterias hepáticas no tratadas y tratadas con catalasa o tiron fue significativamente diferente ($P < 0,01$) a la encontrada en las arterias mesentéricas no tratadas y tratadas con catalasa o tiron.

El DETCA (10^{-3} M) no cambió la relajación ni la sensibilidad (pD_2) a la acetilcolina en las arterias hepáticas (10 segmentos de 5 pacientes cirróticos) ni en las arterias mesentéricas (7 segmentos de 4 donantes).

El DPI (5×10^{-6} M) aumentó la relajación máxima sin modificar la sensibilidad (pD_2) a la acetilcolina en las arterias hepáticas (8 segmentos de 4 pacientes). El DPI no cambió los efectos de la acetilcolina en las arterias mesentéricas (10 segmentos de 4 donantes).

La Figura 11 resume la respuesta a la acetilcolina en las arterias hepáticas y mesentéricas no tratadas y tratadas con catalasa, tiron, DETCA o DPI.

La relajación a la acetilcolina en las arterias hepáticas en presencia de la combinación de catalasa (1000 U/ml) más L-NAME (10^{-4} M) (8 segmentos de 4 pacientes), o de la combinación de tiron (10^{-2} M) más L-NAME (10^{-4} M) (9 segmentos de 4 pacientes) fue significativamente menor que la relajación en presencia de catalasa o tiron solos, respectivamente, y fue similar a la encontrada en las tratadas con el L-NAME solo (Figura 12). En las arterias mesentéricas, la relajación a la acetilcolina en presencia de la combinación de

catalasa (1000 U/ml) más L-NAME (10^{-4} M) (7 segmentos de 4 donantes), o de la combinación de tiron (10^{-2} M) más L-NAME (10^{-4} M) (8 segmentos de 4 donantes) fue similar a la encontrada en presencia del L-NAME solo, y fue menor que la encontrada con catalasa o tiron solos, respectivamente (Figura 12).

La Tabla 4 resume la relajación máxima y los valores de la pD_2 obtenidos con acetilcolina, en las diferentes condiciones. La Tabla 5 resume la relajación máxima y los valores de pD_2 obtenidos con nitroprusiato sódico en las diferentes condiciones.

Como el efecto del nitroprusiato sódico fue similar en las arterias hepáticas y en las arterias mesentéricas, este fármaco no fue probado en presencia de la combinación de L-NAME más meclofenamato, o la combinación de apamina más caribdotoxina, o la combinación de estos cuatro bloqueantes. Tampoco fue probado en presencia de catalasa, tiron, DETCA, DPI, o las combinaciones de L-NAME con catalasa o con tiron.

En las arterias en condiciones de reposo la apelina (10^{-10} a 10^{-6} M) no produjo ningún efecto en ambos tipos de arterias. En las arterias hepáticas y mesentéricas contraídas con el análogo del tromboxano A_2 , la apelina (10^{-10} a 10^{-6} M) produjo relajación dependiente de la concentración, pero esta relajación fue significativamente menor en las arterias hepáticas (25 segmentos de 8 pacientes) que en las arterias mesentéricas (14 segmentos de 5 donantes). La sensibilidad (pD_2) para este péptido fue similar en ambos tipos de arterias (Figura 13).

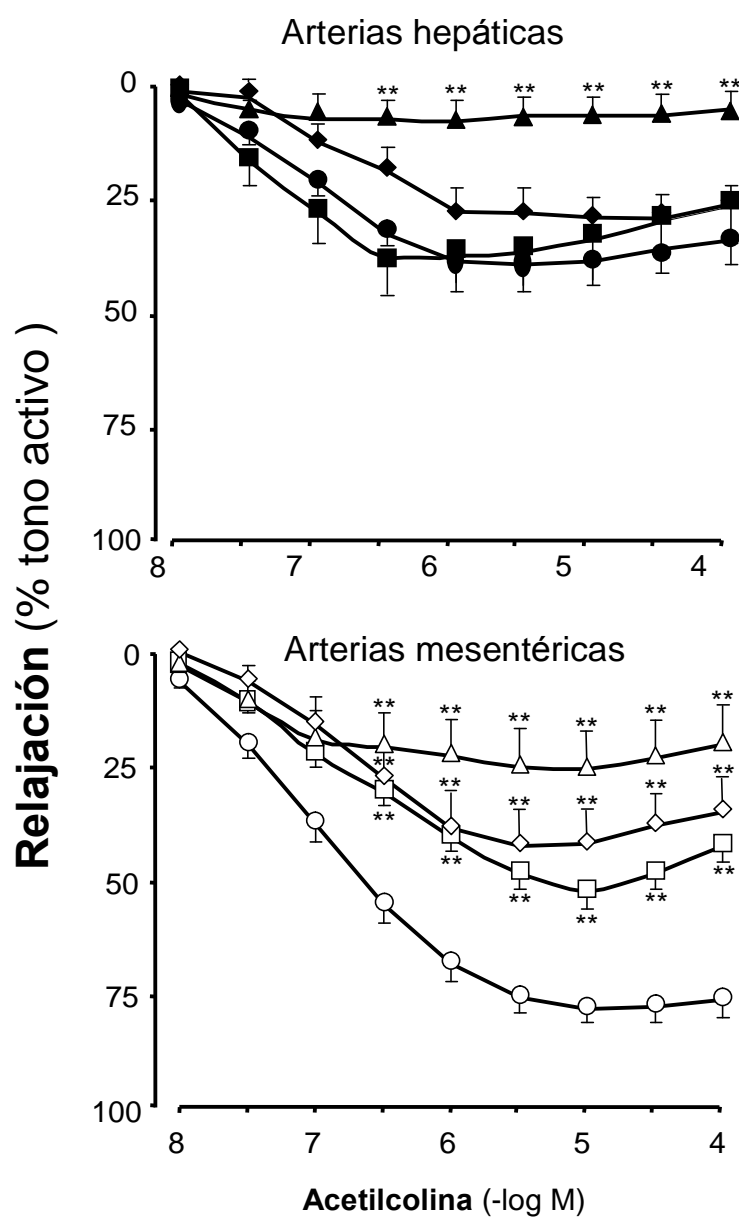


Figura 10. Resumen de la respuesta relajadora a la acetilcolina obtenida en las arterias hepáticas (arriba) y las arterias mesentéricas (abajo): sin tratamiento (●,○); tratadas con la combinación de L-NAME + meclofenamato (■,□); tratadas con la combinación de apamina + caribdotoxina (◆,◇); y tratadas con la combinación de L-NAME + meclofenamato + apamina + caribdotoxina (▲,△). **P<0.01, comparadas con las no tratadas.

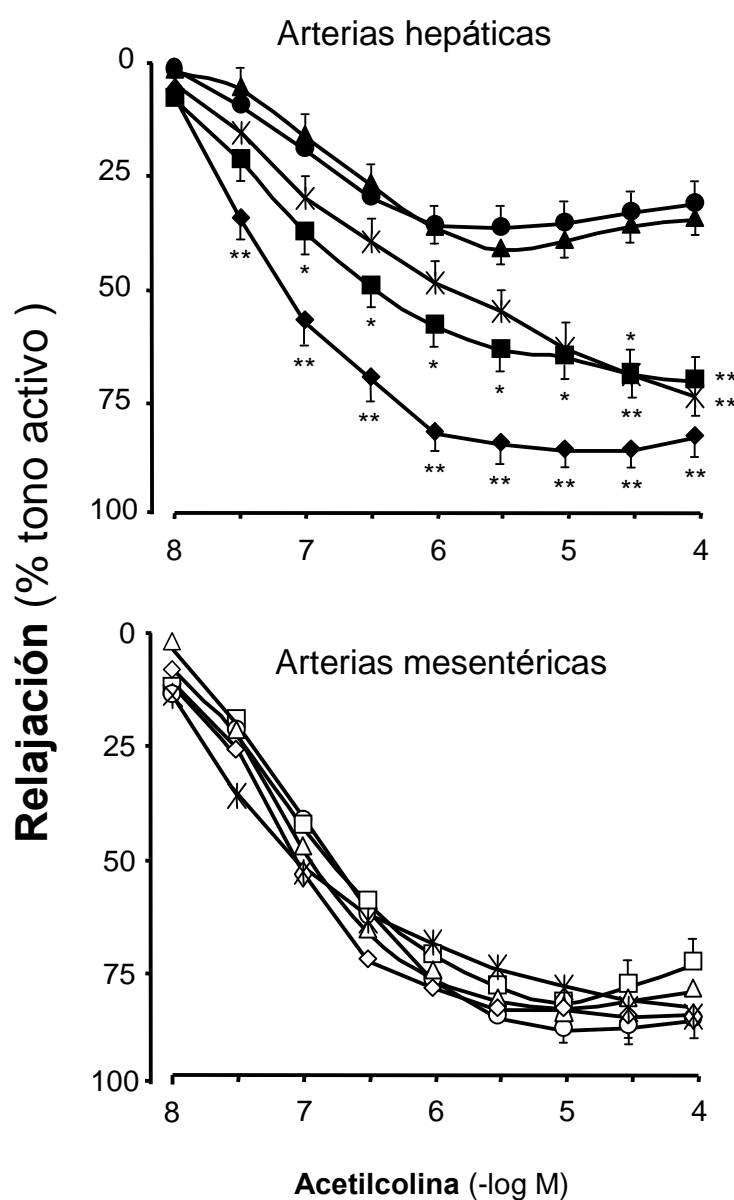


Figura 11. Resumen de la respuesta relajadora a la acetilcolina obtenida en las arterias hepáticas (arriba) y las arterias mesentéricas (abajo): sin tratamiento (●,○); tratadas con catalasa (■,□); tratadas con DETCA (▲,△); tratadas con tiron (◆,◇); tratadas con DPI (X,X). *P<0.05; **P<0.01, comparadas con las no tratadas.

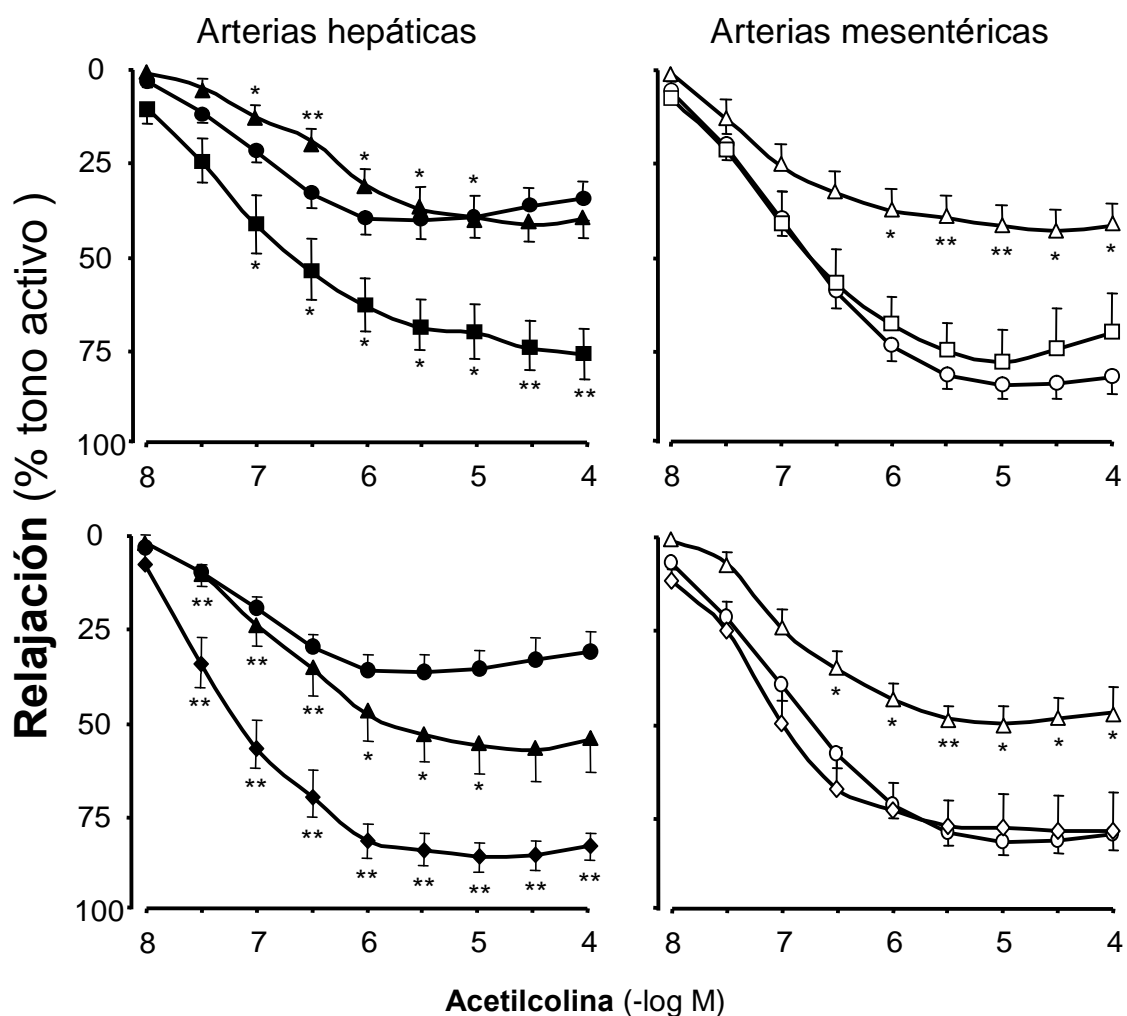


Figura 12. Resumen de la respuesta relajadora a la acetilcolina obtenida en las arterias hepáticas (izquierda) y las arterias mesentéricas (derecha): sin tratamiento (●,○); tratadas con catalasa (■,□); tratadas con catalasa + L-NAME (▲,△); tratadas con tiron (◆,◇); y tratadas con tiron + L-NAME (♣,♢). *P<0.05; **P<0.01, comparadas con las no tratadas.

Tabla 4. Relajación máxima (porcentaje del tono inducido con U46619) y pD_2 para la **acetilcolina** en arterias hepáticas y mesentéricas no tratadas y tratadas con L-NAME, meclofenamato, combinación de L-NAME + meclofenamato, combinación de apamina + caribdotoxina, combinación de L-NAME + meclofenamato + apamina + caribdotoxina, catalasa, tiron, dietilditiocarbamato (DETCA), cloruro de difenileneiodonium (DPI), combinación de catalasa + L-NAME o combinación de tiron + L-NAME .

<u>Acetilcolina</u>	<u>Arterias hepáticas</u>		<u>Arterias mesentéricas</u>	
	relajación	pD_2	relajación	pD_2
No tratadas	35±4 **	6.82±0.11	76±3	6.85±0.09
L-NAME ($10^{-4}M$)	19±7	6.50±0.22	31±7 ++	5.71±0.15 +,*
Meclofenamato ($10^{-5}M$)	36±10	6.70±0.26	54±8	6.69±0.20
L-NAME ($10^{-4}M$) + meclofenamato ($10^{-5}M$)	35±8	6.76±0.33	51±4 ++	6.65±0.13
Apamina ($10^{-6}M$) + Caribdotoxina ($10^{-7}M$)	27±5	6.30±0.19	41±11 ++	6.48±0.17
L-NAME ($10^{-4}M$) + meclofenamato ($10^{-5}M$) +Apamina ($10^{-6}M$) + caribdotoxina ($10^{-7}M$)	7±4 ++	6.65±0.35	25±9 ++	6.70±0.27
Catalasa (1000U/ml)	68±7 ++	6.77±0.28	70±8	6.96±0.20
Tiron ($10^{-2}M$)	83±4 ++	7.23±0.18	73±10	7.01±0.21
DETCA ($10^{-3}M$)	40±7 *	6.71±0.14	72±14	6.96±0.17
DPI ($5 \times 10^{-6}M$)	71±9 ++	6.39±0.28	73±7	7.16±0.18
Catalasa (1000U/ml) + L-NAME ($10^{-4}M$)	37±6	6.48±0.16	39±6 ++	7.03±0.18
Tiron ($10^{-2}M$) + L-NAME ($10^{-4}M$)	56±8	6.72±0.14	46±4 ++	6.83±0.15

* $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$, diferencia estadística entre las arterias hepáticas y mesentéricas en las condiciones correspondientes.

+ $P < 0.01$ y ++ $P < 0.01$, diferencia estadística entre las arterias tratadas y no tratadas, para cada tipo de arterias.

Tabla 5. Relajación máxima (porcentaje del tono inducido con U46619) y pD_2 para el **nitroprusiato sódico** en arterias hepáticas y arterias mesentéricas no tratadas y tratadas con L-NAME o meclofenamato.

	<u>Arterias hepáticas</u>		<u>Arterias mesentéricas</u>	
	Relajación	pD_2	Relajación	pD_2
No tratadas	99±1	6.35±0.21	93±4	6.37±0.26
L-NAME ($10^{-4}M$)	89±7	6.56±0.27	90±6	6.97±0.22
Meclofenamato ($10^{-5}M$)	100±0	6.75±0.31	98±2	6.54±0.09

* $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$, diferencia estadística entre las arterias hepáticas y mesentéricas en las condiciones correspondientes.

+ $P < 0.01$ y ++ $P < 0.01$, diferencia estadística entre las arterias tratadas y no tratadas, para cada tipo de arterias.

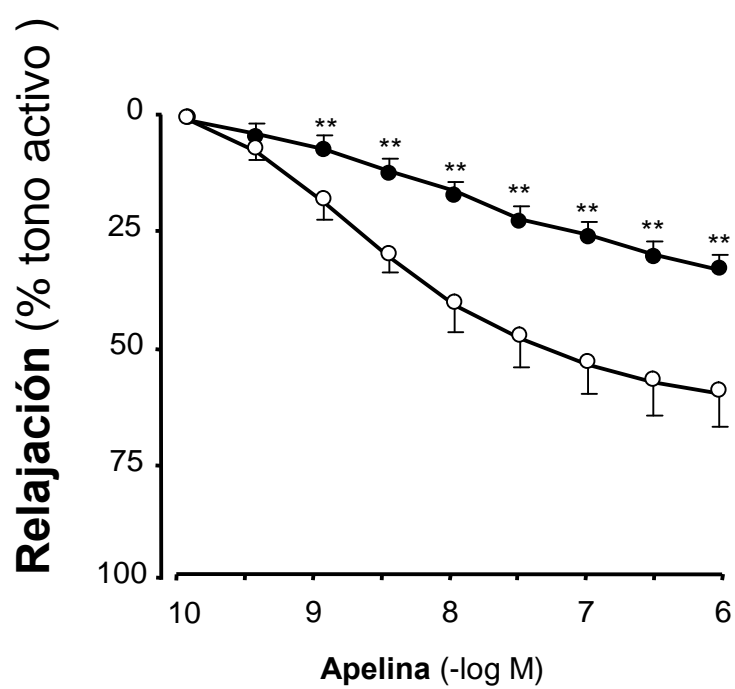


Figura 13. Resumen de la respuesta relajadora a la apelina obtenida en las arterias hepáticas (●) y en las arterias mesentéricas (○). **P<0.01.

El L-NAME (10^{-4} M) inhibió la relajación sin modificar la sensibilidad (pD_2) a la apelina en las arterias mesentéricas (9 segmentos de 4 donantes), y no alteró la relajación en las arterias hepáticas (12 segmentos de 5 pacientes). La diferencia en la relajación a la apelina entre las arterias hepáticas y mesentéricas tratadas con el L-NAME fue significativamente mayor ($P < 0.05$) que la encontrada entre las arterias hepáticas tratadas y no tratadas con L-NAME (Figura 14).

El meclofenamato (10^{-5} M) no modificó la relajación o la sensibilidad (pD_2) a la apelina en las arterias hepáticas (13 segmentos de 5 pacientes) ni en las arterias mesentéricas (7 segmentos de 4 pacientes) (Figura 14).

La Tabla 6 resume la relajación máxima y los valores de pD_2 obtenidos con apelina en las arterias hepáticas y mesentéricas en las diferentes condiciones.

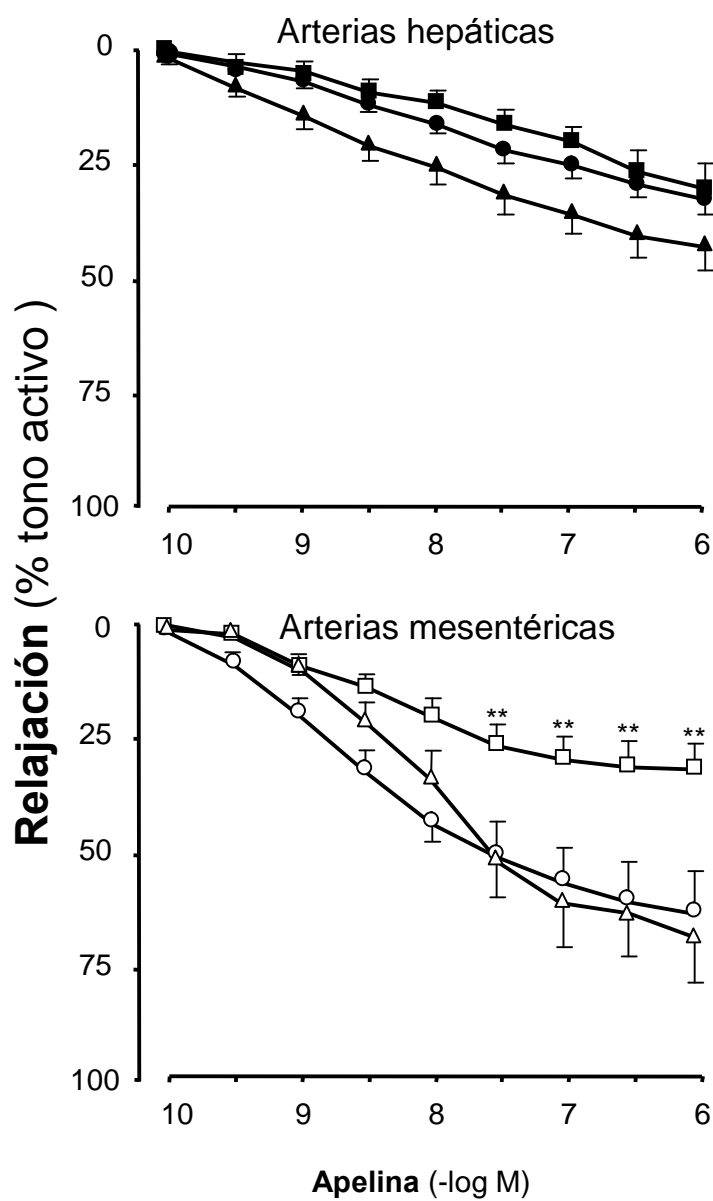


Figura 14. Resumen de la respuesta relajadora a la apelina obtenida en las arterias hepáticas (arriba) y en las arterias mesentéricas (abajo): sin tratamiento (●,○); tratadas con L-NAME (■,□) o tratadas con meclofenamato (▲,△). **P<0.01.

Tabla 6. Relajación máxima (porcentaje del tono inducido con U46619) y pD_2 para la **apelina** en arterias hepáticas y arterias mesentéricas no tratadas y tratadas con L-NAME o meclofenamato.

	<u>Arterias hepáticas</u>		<u>Arterias mesentéricas</u>	
	Relajación	pD_2	Relajación	pD_2
No tratadas	34±3 *	8.14±0.15	61±9	8.41±0.15
L-NAME ($10^{-4}M$)	31±6	7.91±0.23	30±7 ++	8.28±0.08
Meclofenamato ($10^{-5}M$)	44±6	8.27±0.18	67±9	7.98±0.27

* $P<0.05$ y ** $P<0.01$, diferencia estadística entre las arterias hepáticas y mesentéricas en las condiciones correspondientes.

+ $P<0.01$ y ++ $P<0.01$, diferencia estadística entre las arterias tratadas y no tratadas, para cada tipo de arterias.

DISCUSIÓN

La cirrosis hepática en su estadio terminal, tanto experimental como clínica, se acompaña de un estado circulatorio hiperdinámico caracterizado por aumento del gasto cardíaco, hipotensión arterial y marcada vasodilatación sistémica, incluida la circulación esplácnica (Hadoke PW y Hayes PC, 1997). El mecanismo por el cual se produce esta situación hemodinámica no se conoce aún (Wiest R y Groszman RJ, 2002; Colle IO et al., 2004; Mathie RT et al., 1996). Varias líneas de investigación sugieren que esta anomalía esta producida por un exceso en la producción de vasodilatadores endógenos (Benoit JN, et al., 1984; Sitzman JV, et al., 1989) y/o por la disminución de la respuesta vascular a estímulos vasoconstrictores (Kiel JW et al., 1985; Lunzer MR et al., 1975; Pizcueta MP et al., 1990). Uno de los vasodilatadores que ha sido involucrado es el NO ya que durante la cirrosis su producción puede estar aumentada, y este exceso de NO produciría marcada vasodilatación e interferiría con la respuesta vasoconstrictora. Esta elevada producción de NO puede tener lugar en el endotelio vascular y en las células musculares lisas de la pared vascular (Shav V, 2001; Wiest R y Groszmann RJ, 2002; Atucha NM, et al., 2005).

Los estudios realizados para conocer el estado funcional del endotelio de los vasos de la circulación esplácnica y sistémica durante la cirrosis son escasos, especialmente en los vasos sanguíneos humanos, y los resultados encontrados en estos estudios son contradictorios (Mathie RT, et al., 1996; Colle IO, et al., 2004; Claria J, et al., 1994; Albillos A et al., 1995). Este escaso conocimiento del estado funcional del endotelio vascular dificulta la

interpretación de los resultados obtenidos en los diferentes estudios llevados a cabo para estudiar la función vascular. Este tipo de estudio ha constituido el principal objetivo de nuestro trabajo.

En el presente trabajo hemos utilizado arterias hepáticas de pacientes cirróticos sometidos a transplante hepático. Esta arteria pertenece a la circulación esplácnica y se sabe que está dilatada en los pacientes con cirrosis (Hadoke PWF and Hayes PC, 1997) y ha sido utilizada para este tipo de estudio por otros investigadores (Hadoke PWF et al., 1995; Heller J et al., 1996; Smith REA et al., 1997). Estas arterias fueron obtenidas inmediatamente después de ser extraído el hígado durante el transplante, y fueron almacenadas en condiciones adecuadas, desde el momento de su extracción hasta su llegada al laboratorio. Los resultados encontrados en las arterias hepáticas de pacientes cirróticos se comparan con los obtenidos en arterias mesentéricas de los donantes de hígado. Estas arterias mesentéricas fueron obtenidas en el momento del transplante a partir de los tejidos previamente extraídos de los donantes, y también eran almacenadas en condiciones adecuadas. Ambos tipos de arterias fueron colocadas en un medio de conservación de órganos para trasplantes (CELSIOR) y al llegar al laboratorio este medio era sustituido por suero salino fisiológico frío. En este medio las arterias eran disecadas y cortadas en segmentos de 2 mm de longitud, y colocadas en el baño de órganos. El líquido de estos baños era renovado varias veces durante el periodo de equilibración (2-2.5 h), por lo que es probable que las arterias estuviesen prácticamente libres de las drogas que habían recibido los pacientes durante sus previos tratamientos. Por tanto, estos

tratamientos probablemente no han afectado los resultados obtenidos en nuestro estudio.

En este trabajo se han utilizado arterias mesentéricas debido a que las arterias hepáticas de los donantes no estaban disponibles, ya que eran usadas durante el transplante hepático. Se ha descrito que la respuesta a la acetilcolina y los mecanismos involucrados en esta respuesta, son similares en las arterias hepáticas y mesentéricas de ratas normales (Chauhan S, et al., 2003; Zigmunt PM, et al., 1995), lo cual sugiere que ambos tipos de arterias muestran similar relajación dependiente del endotelio en respuesta a la acetilcolina. Asimismo, se ha observado que la respuesta adrenérgica es similar en las arterias hepáticas y mesentéricas humanas (Hadoke et al., 1995). Aunque no podemos excluir que la respuesta de las arterias hepáticas y mesentéricas sea afectada de forma diferente durante la cirrosis, así como por el tratamiento que recibieran los pacientes cirróticos antes del transplante, la comparación realizada entre arterias hepáticas y mesentéricas en nuestro estudio puede ser aceptable. La influencia de los factores de riesgo cardiovascular (hipertensión, hipercolesterolemia, tabaquismo) presentes en algunos de los pacientes cirróticos puede representar un papel menor en las diferencias observadas entre las arterias hepáticas y mesentéricas, ya que estos factores de riesgo también estaban presentes de forma similar en los donantes.

Ambos tipos de arterias mostraban una buena capacidad para contraerse cuando se estimulaban con cloruro potásico y esta cualidad estuvo presente tanto al inicio como al final de los experimentos. Esto sugiere que el músculo

liso tanto de las arterias hepáticas como de las mesentéricas conservaba su capacidad para contraerse en respuesta a su estimulación directa. Además, durante el periodo de equilibración se observó que ambos tipos de arterias se relajaban de manera similar. Nuestros resultados con KCl concuerdan con los observados por otros investigadores, indicando que el músculo liso vascular conserva su capacidad contráctil durante la cirrosis (HadoKe et al., 1996; Vaughan RB et al., 2005)

Es conocido que el endotelio desempeña un papel clave en la regulación del tono vascular debido a su capacidad para liberar sustancias vasoactivas en respuesta a estímulos endógenos y exógenos. Entre las sustancias vasoactivas liberadas por el endotelio unas son vasodilatadores (NO, prostaciclina, EDHF) y otras son vasoconstrictoras (ET, TXA₂) y entre las sustancias que producen vasodilatación mediada por el endotelio se encuentran la acetilcolina, el ATP (adenosin trifosfato), la sustancia P, la bradicinina, la serotonina, la vasopresina, la angiotensina II y la histamina (Baron et al., 1999). De ahí el hecho crucial que tiene el conocer si el endotelio está íntegro o dañado, pues un estímulo vasoactivo puede producir efectos contrarios en el tono vascular, dependiendo de si el endotelio está intacto o no.

Hay datos sugiriendo que el estado del endotelio y el papel del NO durante la cirrosis es distinto en los vasos intra- y extra-hepáticos. Las alteraciones hemodinámicas en la circulación esplácnica e intrahepática parecen ser muy diferentes, pues se ha observado vasoconstricción y disminución en la respuesta vasodilatadora en los vasos intrahepáticos, y por el contrario

vasodilatación e hiporespuesta vasoconstrictora en la circulación esplácnica (Shah V, 2001; Wiest R y Groszmann RJ, 2002). La disfunción endotelial con incremento en la respuesta vasoconstrictora en el lecho vascular intrahepático durante la cirrosis se atribuye a un aumento en la producción de tromboxano A₂ mediado por la COX-1 y no por la COX-2 (Graupera M, et al., 2003). Las condiciones que rodean los vasos intrahepáticos y extrahepáticos (esplácnicos) durante la cirrosis son diferentes, y por ello el estado del endotelio y la respuesta vascular de ambos tipos de vasos podrían cambiar de forma distinta (Shah V, 2001; Wiest R y Groszmann RJ, 2002). Las diferencias en los vasos intra- y extra-hepáticos han sido relacionadas con una alteración opuesta en la función del NO en la circulación intra y extrahepática (esplácnica) durante la cirrosis (Shah V, 2001; Wiest R y Groszmann RJ, 2002): habría disminución en la síntesis y/o liberación de NO en la circulación intrahepática, mientras que en la circulación esplácnica habría un aumento en la formación y/o liberación de NO. Tanto el aumento de la producción de NO en la circulación extrahepática (causada por la sintasa de NO inducible, o por estimulación de la sintasa de NO endotelial) como la disminución en la circulación intrahepática (por déficit intrahepático de sintasa de NO endotelial), podrían coexistir durante la cirrosis (Cahill P. et al., 2001).

Examinando la respuesta a diferentes sustancias vasoactivas en vasos sanguíneos de pacientes con cirrosis y de modelos experimentales de cirrosis, los resultados han sido controvertidos. Se ha descrito que los vasos sanguíneos del antebrazo de pacientes cirróticos muestran un aumento en la relajación dependiente del endotelio utilizando metacolina, sugiriendo que

existe un aumento en la síntesis de NO en la circulación sistémica durante la cirrosis (Albillos A, et al., 1995). En el caso de arterias procedentes de pacientes con cirrosis, se ha descrito que la relajación a la acetilcolina y a la sustancia P está conservada (Vaughan RB et al., 2005), mientras que otros han descrito que la relajación a la acetilcolina está disminuida, lo cual estaría relacionado con la presencia de disfunción endotelial (Smith REA et al., 1997). Utilizando arterias de animales con cirrosis experimental, se ha observado que en anillos aórticos muestran que está aumentada la relajación dependiente de NO en respuesta a la acetilcolina y ADP, sugiriendo que existe un aumento en la síntesis de NO en la circulación sistémica durante la cirrosis (Claria J, et al., 1994). Por otra parte, los vasos mesentéricos de ratas cirróticas muestran una disminución de la vasodilatación dependiente del endotelio al estimularse con acetilcolina, así como de la vasodilatación independiente del endotelio al estimularse con pinacidil o deta-NONOate (donadores de NO), sugiriendo que el daño está en el músculo liso vascular (Colle IO, et al., 2004). También se ha descrito disminución en la relajación independiente del endotelio valorada con nitroprusiato sódico, mientras que la relajación dependiente del endotelio valorada con acetilcolina es normal en vasos mesentéricos de ratas cirróticas (Mathie RT, et al., 1996). Otro tipo de estudios describen que está alterada la respuesta a la acetilcolina (Barriere et al., 2000; Atucha et al., 1996; Karatapanis et al., 1994; Michielsen et al., 1995a; Rastegar et al., 2001), al nitroprusiato sódico (Safka et al., 1997) y a la prostaciclina (Safka et al., 1997; Oberti et al., 1993), mientras que otros estudios informan que la repuesta a la acetilcolina (Sogni et al., 1996; Michielsen P.P. et al., 1995b; Sogni et al., 1997)

y al nitroprusiato sódico (Atucha et al., 1996; Garcia-Estan J. et al., 1996; Albillos et al., 1995) es normal. Es importante resaltar que la mayoría de estos estudios se han realizado en la aorta procedente de animales con cirrosis experimental (Barriere et al., 2000; Atucha et al., 1996; Karatapanis et al., 1994; Michielsen et al., 1995a; Rastegar et al., 2001; Sogni et al., 1996; Michielsen P.P. et al., 1995b; Sogni et al., 1997; Gadano et al., 1999). Por tanto, la comparación de unos estudios y otros debe hacerse con cautela por las posibles diferencias entre especies y tipo de cirrosis. Las discrepancias observadas pueden deberse, en parte, a las diferencias entre las especies estudiadas, entre los modelos de cirrosis experimental utilizados y entre los métodos utilizados para estudiar la respuesta vascular.

En nuestro estudio hemos encontrado que la relajación producida por la acetilcolina en las arterias hepáticas de pacientes cirróticos estaba disminuida en comparación con la observada en las arterias mesentéricas de los donantes, mientras que la relajación producida por el nitroprusiato sódico fue similar en ambos tipos de arterias. Estos resultados sugieren que las arterias hepáticas de pacientes cirróticos presentan disfunción endotelial y que la capacidad de relajación en respuesta a la estimulación directa del músculo liso vascular está preservada. Esto está de acuerdo con los resultados obtenidos por Colle IO et al (2004) en la arteria mesentérica de ratas con cirrosis e hipertensión portal, donde se describe que esta disminuida la relajación vascular dependiente del endotelio en respuesta a la acetilcolina. Sin embargo, nuestros resultados difieren de estos estudios (Colle IO et al., 2004) ya que estos autores describen

disminución en la relajación vascular en respuesta a la estimulación directa del músculo liso vascular con pinacidil y con deta-NONOATE y nosotros observamos que la relajación al nitroprusiato sódico era normal. La discrepancia entre este estudio (Colle et al., 2004) y el nuestro podría estar relacionada, al menos en parte, con la diferencia entre las especies estudiadas, el procedimiento experimental (in vitro vs in vivo), y las sustancias utilizadas para producir relajación endotelial. Mathie RT et al., (1996), utilizando la arteria mesentérica aislada de ratas cirróticas, observaron que la relajación dependiente del endotelio en respuesta a la acetilcolina y al ATP está preservada, mientras que la relajación independiente del endotelio en respuesta al nitroprusiato sódico está disminuida. Las diferencias entre los estudios de Colle IO, et al., (2004) y Mathie RT, et al., (1996) por un lado y los nuestros por otro, pueden ser debidos a las diferencias en las especies estudiadas y al tipo de cirrosis.

Se ha observado que la inhibición no específica de la actividad del NO con azul de metileno (esta sustancia inhibe el GMP cíclico), en pacientes con cirrosis alcohólica descompensada, revierte la intensidad de la hipotensión arterial asociada con esta enfermedad (Midgely S et al., 1991). Durante la perfusión de arterias mesentéricas de ratas con cirrosis e hipertensión portal, se encontró que estaba disminuida la respuesta a la noradrenalina, vasopresina, cloruro de potasio y metoxamina, y se consideró que ésto era debido, en parte, al aumento de la liberación de NO (Sieber et al., 1992; Sieber et al., 1993). En esta misma línea se describe que la inhibición de la síntesis de NO en ratas con ligadura parcial de la vena porta no modificó la presión de

perfusión comparada con los controles, pero si restauró la respuesta a estímulos vasoconstrictores (Barry A 1998). Otros estudios han demostrado que la disminución de la respuesta a la metoxamina en arterias mesentéricas de ratas con cirrosis inducida por carbón tetraclorhídrico, puede ser solo restaurada a niveles normales usando L-NAME (Mathie RT et al., 1996). Es probable que los cambios en el tono vascular durante la hipertensión portal puedan variar de acuerdo con la localización anatómica; por ejemplo anillos aórticos de ratas con cirrosis inducida por carbón tetraclorhidrico tienen disminuida la respuesta a la angiotensina II, fenómeno no encontrado en la microvasos intrahepáticos, y este hallazgo fue atribuido a un aumento en la síntesis de NO (Castro et al., 1993).

Nosotros observamos que el L-NAME y meclofenamato inhiben la relajación de las arterias mesentéricas frente a la acetilcolina, pero no afectaron esta relajación en las arterias hepáticas de pacientes cirróticos. La combinación del L-NAME y meclofenamato produjo un efecto similar al producido por el L-NAME o meclofenamato solos en la respuesta colinérgica tanto en las arterias hepáticas como las mesentéricas. Estos resultados sugieren que el NO y la prostaciclina están involucrados en la relajación colinérgica de las arterias esplácnicas (mesentéricas) normales y que la función de ambas sustancias en esta relajación está disminuida en las arterias esplácnicas (hepáticas) de pacientes cirróticos. Esta diferencia entre las arterias de pacientes cirróticos y de donantes podría deberse en parte a la disminución en la liberación y/o biodisponibilidad de NO y de prostaciclina en las arterias esplácnicas durante la cirrosis. Se ha descrito que la disminución de la respuesta a la acetilcolina y

pinacidil en los vasos mesentéricos de ratas cirróticas se mantiene tras la inhibición combinada de la sintasa de NO y de la ciclooxigenasa (Colle IO, et al., 2004). Un fenómeno semejante estaba presente en nuestros experimentos donde el L-NAME combinado con el meclofenamato no varió la respuesta a la acetilcolina ni al nitroprusiato sódico en las arterias hepáticas de los pacientes cirróticos. Se ha observado aumento en la expresión de COX-1 en la arteria mesentérica superior junto con un aumento de los niveles plasmáticos de prostaciclina durante la hipertensión portal en ratas (Hou MC, et al., 1998).

La combinación de apamina (bloqueante de los canales pequeños de potasio dependientes de calcio) más caribdotoxina (bloqueante de los canales grandes e intermedios de potasio dependientes de calcio) no modificó la relajación a la acetilcolina en las arterias hepáticas, pero si la disminuyó en las arterias mesentéricas. Asimismo, la combinación de apamina más caribdotoxina más L-NAME más meclofenamato fue capaz de inhibir la relajación a la acetilcolina tanto en las arterias hepáticas como en las mesentéricas. Esta inhibición fue mayor que la producida por la combinación de L-NAME más meclofenamato, y fue de similar magnitud en ambos tipos de arterias. Por tanto, sugerirnos que las arterias esplácnicas de los pacientes cirróticos y las normales (de los donantes de hígado), presentan una relajación colinérgica mediada en parte a través de un EDHF, el cual activaría los canales de potasio dependientes de calcio del músculo liso vascular, y que el componente mediado por este EDHF sería comparable en ambos tipos de arterias. Resultados obtenidos en arterias mesentéricas de ratas con cirrosis y expuestas al inhibidor de la sintasa del NO o al inhibidor de la ciclooxigenasa,

muestran que un EDHF podría reemplazar al NO y/o prostanoïdes para mediar la relajación colinérgica (Barriere et al., 2000).

También se ha descrito que parte de la vasodilatación que se produce durante la cirrosis podría ser independiente del NO y estaría causada por un péptido vasodilatador dependiente del endotelio y/o por un defecto primario en las células musculares lisas de las arterias esplácnicas (Heinemann A y Stauber RE, 1996; Heinemann A, et al., 1997). En relación con este último mecanismo, se ha mencionado el aumento en la expresión de ciclooxigenasa-1 en la arteria mesentérica superior y el aumento de los niveles plasmáticos de prostaciclina durante la hipertensión portal (Hou MC et al., 1998).

Con respecto a las especies reactivas de oxígeno, observamos que el tratamiento con catalasa (catalizador de la degradación del peróxido hidrógeno), tiron (mimético de la superóxido dismutasa) o DPI (inhibidor de la NAD(P)H oxidasa) aumenta la respuesta de las arterias hepáticas a la acetilcolina sin afectar esta respuesta en las arterias mesentéricas. Además, en presencia de catalasa o tiron la respuesta de las arterias hepáticas a la acetilcolina fue similar a la encontrada en las arterias mesentéricas no tratadas. El DETCA (inhibidor de la superóxido dismutasa) no modificó el efecto de la acetilcolina en ambos tipos de arterias. Asimismo, en presencia de catalasa o tiron, el L-NAME fue capaz de inhibir la relajación a la acetilcolina en arterias hepáticas, fenómeno no observado en las arterias hepáticas no tratadas. El efecto inhibitor del L-NAME en la relajación colinérgica de las arterias mesentéricas fue similar en las arterias no tratadas o tratadas con catalasa o tiron. Por tanto,

la catalasa y tiron, y DPI en menor grado, revierten la disminución de la relajación colinérgica de las arterias espláncicas de pacientes cirróticos. Los datos encontrados con DPI sugieren que el supuesto incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno, particularmente de anión superóxido, se produciría en parte a través de la NAD(P)H oxidasa. La ausencia de efecto del DETCA sobre la respuesta a la acetilcolina sugiere que la actividad de la superóxido dismutasa es menor en ambos tipos de arterias. Como el componente mediado por el EDHF en la relajación colinérgica fue similar en ambos tipos de arterias, no exploramos si el papel del EDHF en esta relajación es afectado o no por las especies reactivas de oxígeno.

Nuestros resultados sugieren que las especies reactivas de oxígeno podrían producir disfunción endotelial y disminuir la producción y/o biodisponibilidad de NO y prostaciclina en los vasos sanguíneos espláncicos durante la cirrosis. La posibilidad de que las especies reactivas del oxígeno induzcan la disfunción de los canales de potasio dependientes de calcio en el músculo liso arterial podría excluirse razonablemente puesto que en una serie de experimentos no mostrados en este trabajo, observamos que la relajación de las arterias hepáticas al peróxido de hidrógeno, bloqueado por la combinación de apamina más caribdotxina, no estaba alterada (estos datos no se muestran). Se ha descrito que la producción de especies reactivas de oxígeno puede estar aumentada en pacientes con cirrosis (Adachi T, et al., 2005; Szuster-Ciesielska A, et al., 2002) y que estas especies podrían estar implicadas en la fisiopatología de las alteraciones vasculares durante la cirrosis (Bomzon A, y Ljubuncic P, 2001; Fernando B, et al., 1998; Huang YT, et al.,

2003). Asimismo, se ha descrito que estas especies pueden producir efectos deletéreos en el endotelio y la función vascular (Griendling KK, y FitzGerald GA, 2003; Kojda G, y Harrison D, 1999). Así pues, considerando estos estudios y nuestros resultados, podemos sugerir que la disfunción endotelial observada en las arterias esplánicas (hepáticas) de pacientes cirróticos podría deberse a un exceso de especies reactivas de oxígeno en la pared vascular, quizá como consecuencia de un aumento en la producción de estas especies durante la cirrosis. Esta sugerencia se basa en observaciones indirectas, y por tanto necesita ser confirmada con estudios bioquímicos y moleculares que midan directamente la producción del anión superóxido y la expresión de la superóxido dismutasa en tejidos vasculares de pacientes cirróticos. Por tanto, nuestros resultados sugieren que la cirrosis induce disfunción endotelial con disminución de la producción y/o biodisponibilidad de NO y/o prostaciclina en las arterias esplánicas, y esto podría ser causado en parte por el aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno.

Aprovechando la realización de nuestro estudio con acetilcolina, decidimos estudiar el efecto de un péptido recientemente descubierto, y que ha despertado el interés por su posible función en la regulación de la función gastro-intestinal y cardiovascular. Este péptido es la apelina, de la cual hay péptidos de 36, 17, 13, y 12 aminoácidos, que están presentes en el plasma de bóvidos, ratas y ratones y humanos (Tatemoto et al., 2001). En las arterias en reposo, la apelina no produjo efecto en las arterias hepáticas ni en las arterias mesentéricas. Cuando las arterias estaban precontraídas, la apelina produjo

relajación, pero esta respuesta fue menor en las arterias de pacientes cirróticos que en las arterias de los donantes de hígado, como ocurría con la acetilcolina. En las arterias mesentéricas la relajación máxima a la apelina fue similar a la alcanzada con acetilcolina (en ambos casos fue alrededor a el 60% de la alcanzada con el nitroprusiato sódico), pero la sensibilidad a este péptido fue mucho mayor que a la acetilcolina. En las arterias hepáticas de pacientes cirróticos la relajación máxima a la apelina fue también similar a la alcanzada con acetilcolina (en ambos casos fue el 35% de la alcanzada con el nitroprusiato sódico), y en estas arterias la sensibilidad a la apelina también fue mayor que a la acetilcolina en las arterias normales.

El inhibidor de la síntesis de NO L-NAME inhibió la relajación a la apelina en las arterias mesentéricas, pero no la modificó en las arterias hepáticas. El inhibidor de la ciclooxigenasa meclofenamato no modificó la respuesta a la apelina en ambos tipos de arterias. Estos datos sugieren que la relajación a la apelina podría estar mediada, al menos en parte, por el NO sin participación de prostanoïdes en las arterias esplánicas normales, y que la disminución de esta relajación en las arterias esplánicas de los pacientes cirróticos podría estar relacionada, al menos en parte, con disfunción endotelial acompañada de la disminución en la síntesis y/o liberación de NO. Estos resultados con apelina se parecen, en parte, a los resultados obtenidos en este trabajo con acetilcolina, en el sentido de que en ambos casos la relajación colinérgica y con apelina está disminuida en las arterias esplánicas durante la cirrosis probablemente debido a la disfunción endotelial.

La apelina y sus receptores se expresan en el sistema cardiovascular, y en el adulto esta expresión puede estar restringida al endotelio vascular (Ashley et al., 2006; 4; Katugampola et al., 2001). Poco se conoce acerca del efecto de la apelina en los vasos sanguíneos humanos. El sitio de unión de la apelina fue localizado usando autoradiografías de tejido cardiovascular humano, que incluía la arteria coronaria, aorta y en injertos de vena safena humana (Katugampola et al., 2001). En este mismo estudio se demuestra que la (Pyt1)Apelina-13 produce una potente contracción en la vena safena humana sin endotelio con una sensibilidad del orden nanomolar (Katugampola et al., 2001). Nuestros resultados también indican que las arterias esplácnicas son muy sensibles a la apelina, pero contrastan con lo observado en la vena safena (Katugampola et al., 2001) donde se muestra que la apelina produce venoconstricción y nosotros observamos vasodilatación. Esta diferencia puede estar relacionada con que la apelina produce efectos opuestos en arterias y venas, debido a las diferencias en el papel y concentración de receptores AJP en el endotelio y/o en el músculo liso, y a que la liberación de factores vasoactivos en el endotelio venoso y arterial sea diferente. Los estudios realizados en ratas describen que la inyección intravenosa de apelina disminuye la presión arterial sistémica (Kagiyama et al., 2004), y que este péptido podría actuar como dilatador arterial y venoso (Ashley et al., 2006). También se ha encontrado en ratas anestesiadas que la apelina 12, 13 y 36 producen hipotensión, y que el tratamiento con un inhibidor de la síntesis de NO anula el efecto hipotensor de la apelina-12, sugiriendo que la apelina induce hipotensión a través de un mecanismo mediado por NO (Tatemoto et al.,

2001). Nuestros resultados sugieren que este mecanismo de acción de la apelina también podría estar presente en las arterias humanas normales, y que la apelina-13 podría liberar NO mediante activación de receptores específicos localizados en el endotelio. En los resultados obtenidos con acetilcolina nosotros sugerimos que la cirrosis podría acompañarse de disfunción endotelial con disminución en la biodisponibilidad de NO, causada por el estrés oxidativo y aumento en la formación de especies reactivas de oxígeno. Algo similar podría ocurrir con los efectos de la apelina en las arterias esplácnicas de los pacientes cirróticos.

Los resultados obtenidos con apelina aportan por primera vez información acerca del efecto de este péptido en las arterias humanas normales y en las arterias de pacientes cirróticos. Como este péptido está presente en el tracto gastrointestinal (Kleinz y Davenport 2003; Katugampola et al., 2001), y en el sistema cardiovascular (Ashley et al., 2006; Foldes et al., 2003), nuestros resultados sugieren la apelina podría desempeñar un papel significativo en la regulación de la circulación esplácnica en condiciones normales, y también en la fisiopatología del estado circulatorio hiperdinámico presente en los pacientes con cirrosis avanzada. Hay estudios que sugieren que este péptido está implicado en la fisiopatología de la insuficiencia cardíaca (Berry MF et al., 2004), y podría ser atractivo para la farmacoterapia en la enfermedad cardíaca (Ashley et al., 2005).

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Durante la evolución de la cirrosis los pacientes presentan alteraciones cardiovasculares que se caracterizan por un estado circulatorio hiperdinámico con hipotensión arterial sistémica, aumento del gasto cardíaco y disminución de la resistencia vascular sistémica, incluida la circulación esplácnica. Los mecanismos implicados en estas alteraciones circulatorias aun no son bien conocidos, y son muy escasos los estudios dirigidos a conocer el estado funcional del endotelio.

Por tanto, el presente trabajo ha sido realizado para estudiar el estado funcional del endotelio de las arterias esplácnicas de pacientes con insuficiencia hepática terminal, así como para estudiar el papel de las especies reactivas de oxígeno en la posible alteración funcional del endotelio de dichas arterias. Asimismo, se ha estudiado el efecto de la apelina en dichas arterias. Nuestra hipótesis ha sido que durante la cirrosis se altera la función del endotelio vascular, y que esta alteración podría estar causada, al menos en parte, por el aumento en las especies reactivas de oxígeno.

En nuestro estudio se han utilizado arterias hepáticas (esplácnicas) de pacientes cirróticos sometidos a transplante hepático, y los resultados obtenidos en estas arterias se compararon con los obtenidos en arterias mesentéricas (esplácnicas) de los donantes de hígado. En ambos tipos de arterias se determinó la respuesta vascular in vitro a la acetilcolina (vasodilatador dependiente del endotelio), al nitroprusiato sódico (vasodilatador independiente del endotelio) y al péptido apelina. Esto se realizó en ausencia y en presencia de sustancias que inhiben la formación de NO y de prostanoïdes, y los canales de potasio dependientes de calcio, así como en presencia de

sustancias que aumentan o disminuyen la formación de especies reactivas de oxígeno.

Los **RESULTADOS** obtenidos fueron los siguientes:

La relajación a la acetilcolina fue menor en las arterias hepáticas de los pacientes cirróticos que en las arterias mesentéricas de los donantes de hígado, mientras que la relajación al nitroprusiato sódico fue similar en ambos tipos de arterias.

- a) El tratamiento con L-NAME (inhibidor de la síntesis de NO) disminuyó la relajación a la acetilcolina en las arterias mesentéricas, mientras que no la modificó en las arterias hepáticas.
- b) El meclofenamato (inhibidor de la ciclooxigenasa) disminuyó la relajación a la acetilcolina en las arterias mesentéricas, pero no en las arterias hepáticas.
- c) La relajación al nitroprusiato sódico en las arterias hepáticas y mesentéricas no fue modificada por el tratamiento con L-NAME ni por el tratamiento con meclofenamato.
- d) La combinación de L-NAME y meclofenamato, o la de apamina y caribdotoxina (bloqueantes de los canales de potasio dependientes de calcio) disminuyó la relajación a la acetilcolina en las arterias mesentéricas pero no la modificó en las arterias hepáticas.
- e) La asociación de L-NAME, meclofenamato, apamina y caribdotoxina disminuyó la relajación a la acetilcolina en los dos tipos de arterias.

- f) El tratamiento con catalasa (catalizador del peróxido de hidrógeno) o con tiron (mimético de la superóxido dismutasa) aumentaron la relajación a la acetilcolina en las arterias hepáticas, pero no la modificaron en las arterias mesentéricas.
- g) El DETCA (inhibidor de la superóxido dismutasa) no modificó la relajación máxima a la acetilcolina en ambos tipos de arterias.
- h) El DPI (inhibidor de la enzima NADPH oxidasa) aumentó la relajación máxima en las arterias hepáticas mientras que no la modificó en las arterias mesentéricas.
- i) En ambos tipos de arterias, en presencia de la combinación de L-NAME y catalasa o la de L-NAME y tiron disminuyó la relajación en respuesta a la acetilcolina. En estas condiciones, la relajación fue menor que la observada en presencia de catalasa o tiron solos, respectivamente, pero fue similar a la encontrada en presencia de L-NAME solo.
- j) En las arterias en reposo, la apelina no produjo ningún efecto en ambos tipos de arterias. En las arterias precontractadas, la apelina produjo una relajación que fue menor en las arterias hepáticas que en las arterias mesentéricas. El tratamiento con L-NAME disminuyó la relajación a la apelina en las arterias mesentéricas mientras que no la modificó en las arterias hepáticas. El meclofenamato no modificó la respuesta relajadora a la apelina en las arterias hepáticas ni en las arterias mesentéricas.

Estos resultados sugieren las siguientes **CONCLUSIONES**:

1. La cirrosis en su estado avanzado puede inducir disfunción endotelial con disminución de la liberación y/o biodisponibilidad de NO y prostaciclina en las arterias de la circulación esplácnica.
2. Esta disfunción endotelial podría estar causada, al menos en parte, por el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno durante esa enfermedad.
3. La apelina produce relajación en las arterias esplácnicas normales, y esta relajación está mediada, al menos en parte, por NO sin la participación de prostanoïdes. Esta relajación, así como el papel del NO, podría estar disminuida en las arterias esplácnicas de los pacientes cirróticos, y
4. Por último, sugerimos que la disfunción endotelial, junto con las alteraciones circulatorias en su conjunto, podría deberse a los efectos adversos del exceso de especies reactivas de oxígeno durante la cirrosis. Estas especies reactivas dañarían la pared vascular y alterarían la función vascular, incluida la función del endotelio.

BIBLIOGRAFÍA

Adachi T, Togashi H, Suzuki A, Kasai S, Ito J, Sugahara K, and Kawata S. NAD(P)H oxidase plays a crucial role in PDGF-induced proliferation of hepatic stellate cells. *Hepatology* 2005; 41:1272-1281.

Albillos A, Rossi I, Cacho G, Martinez Mv, Millan I, Abreu L, Barrios C, and Escartin P. Enhanced endothelium-dependent vasodilation in patients with cirrhosis. *Am J Physiol* 1995; 268: G459-G464.

Albornoz L, Bandi JC, Gadano A, Laudanno O, Villamil A, and Mastai R. Hyperdynamic circulatory state in portal hypertensive rats is similar to that observed in pregnant rats. *HEPATOLOGY* 1998; 28 (4): 664A-664A 2007 Part 2 Suppl. S

Alexander B. The role of nitric oxide in hepatic metabolism. *Nutrition* 1998, 14:376-390. Review.

Ames RP, Borkowsk AI, Sicinski AM, and Laragh JH. Prolonged infusions of angiotensin 2 and norepinephrine and blood pressure electrolyte balance and aldosterone and cortisol secretion in normal man and in cirrhosis with ascites *journal of clinical investigation* 44 (7): 1171-1186. 1965

Ashley E, Chun HJ, and Quertermous T. Opposing cardiovascular roles for the angiotensin and apelin signaling pathways. *Journal Of Molecular And Cellular Cardiology* 41 (5): 778-781 NOV 2006

Ashley EA, Powers J, Chen M, Kundu R, Finsterbach T, Caffarelli A, Deng A, Eichhorn J, Mahajan R, Agrawal R, Greve J, Robbins R, Patterson AI, Bernstein D, and Quertermous T. The endogenous peptide apelin potently improves cardiac contractility and reduces cardiac loading in vivo. *Cardiovascular Research* 65 (1): 73-82 JAN 1 2005

Atucha N, Shav V, García-Cardena G, Sessa W, and Groszman RJ. Role of endothelium in the abnormal response of mesenteric vessels in rats with portal hypertension and liver cirrhosis. *Gastroenterology* 1996, 111:1627-1632.

Atucha NM, Nadal FI, Iyu D, Alcaraz A, Rodriguez-Barbero A, Ortiz MC, Lopez-Novoa JM, and Garcia-Estan J. Role of vascular nitric oxide in experimental liver cirrhosis. *Curr Vasc Pharmacol* 2005; 3(1):81-85.

Auchschwelk W, Katusic ZS, and Vanhoutte PM. Contractions to oxygen-derived free-radicals are augmented in aorta of the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1989; 13 (6): 859-864 Part 2.

Barlow, R.S. and White, R.E. Hydrogen peroxide relaxes porcine coronary arteries by stimulating BKCa channel activity. *Am J Physiol* 1998; 275, pp. H1283–H1289.

Barlow, R.S., El-Mowafy, A.M. and White, R.E. H₂O₂ opens BKCa channels via the PLA₂-arachidonic acid signaling cascade in coronary artery smooth muscle. *Am J Physiol* 2000; 279, pp. H475–H483.

Baron, V. and Muriel, P. Role of glutathione, lipid peroxidation and antioxidants on acute bile-duct obstruction in the rat. *Biochim Biophys* 1999; *Acta* 1472, pp. 173–180.

Barriere E, Tazi KA, Rona JP, Pessione F, Heller J, Lebrec D, and Moreau R. Evidence for an endothelium-derived hyperpolarizing factor in the superior mesenteric artery from rats with cirrhosis. *Hepatology* 2000;32:935-941.

Barry A. The role of nitric oxide in hepatic metabolism. *Nutrition* 1998; 14, 376.

Battaglia SE, Jones R, Angus JA, Smallwood RA and Angus PW. Altered acetylcholine responsiveness in human 'cirrhotic' intrahepatic arteries. *Hepatology* 24 (4): 68-68 Part 2 Suppl. S, OCT 1996

Bauer C, Walcher F, Kalweit U, Larsen R, and Marzi I. Role of nitric oxide in the regulation of the hepatic microcirculation in vivo. *J. Hepatology* 1997, 27:1089-1095.

Bauer V, Sotnikova R, Machova J, Matyas S, Pucovsky V and Stefek M. Reactive oxygen species induced smooth muscle responses in the intestine,

vessels and airways and the effect of antioxidants. *Life Sci* 1999; 65, pp. 1909–1917.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, and Breeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87, pp. 1620–1624.

Benkusky NA, Lewis SJ, and Kooy NW. Attenuation of vascular relaxation after development of tachyphylaxis to peroxynitrate in vivo. *Am J Physiol* 1998; 275, pp. H501–H508.

Benoit JN, Barrowman JA, Harper SI, Kiretys PR, and Granger DN. Role of humoral factors in the intestinal hyperemia associated with chronic portal hypertension. *Am J Physiol* 1984; 247:G486-G493.

Berry MF, Pirolli TJ, Jayasankar V, Burdick J, Morine KJ, Gardner TJ and Woo YJ. Apelin has in vivo inotropic effects on normal and failing hearts. *Circulation* 110 (11): II187-II193 Suppl. S, SEP 14 2004

Better Os and Bomzon A. Effects of jaundice on the renal and cardiovascular systems. In: *The Kidney in Liver Disease*, 3rd edn., Ch. 23, pp. 508-536, Epstein, M (ed.) Williams and Wilkins, Baltimore. 1988

Bianchi G, Bugianesi E, Ronchi M, Fabbri A, Zoli M and Marchesini G. Glutathione kinetics in normal man and in patients with liver cirrhosis. *J Hepatol* 1997; 26, pp. 606–613.

Blendis L and Wong F. The hyperdynamic circulation in cirrhosis: an overview. *Pharm Ther* 2001; 89: 221-31.

Bomzon A and Blendis LM. Does diminished vascular responsiveness to norepinephrine account for the systemic hypotension of cirrhosis?. *J Gastroenterol Hepatol*. 1990 Jan-Feb;5(1):97-100.

Bomzon A and Blendis LM. Vascular reactivity in experimental portal-Hypertension. *American Journal of Physiology* 252 (2): g158-g162 part 1, feb 1987.

Bomzon A and Huang YT. Vascular smooth muscle cell signaling in cirrhosis and portal hypertension. *Pharmacol Ther.* 2001 Mar; 89(3):255-72.

Bomzon A and Ljubuncic P. Oxidative stress and vascular smooth muscle cell function in liver disease. *Pharmacol Therap* 2001; 89:295-308.

Bomzon A, Finberg JP, Tovbin D, Naidu SG, and Better OS. Bile salts, hypotension and obstructive jaundice. *Clin Sci (Lond).* 1984; 67(2):177-83.

Bomzon A, Gali D, Better OS, and Blendis LM. Reversible suppression of the vascular contractile response in rats with obstructive jaundice. *J Lab Clin Med.* 1985; 105(5):568-72.

Bomzon A, Holt S and Moore K. Bile acids, oxidative stress, and renal function in biliary obstruction. *Semin Nephrol* 1997; 17, pp. 549–562.

Bomzon L, Wilton PB, and McCalden TA. Impaired skeletal muscle vasomotor response to infused noradrenaline in baboons with obstructive jaundice. *Clin Sci Mol Med.* 1978; 55(1):109-12.

Bosch J and Garcia-Pagan JC. Complications of cirrhosis. Portal hypertension *J HEPATOL* 2000; 32: 141-156 Suppl. 1. Review

Burke TM and Wolin MS. Hydrogen peroxide elicits pulmonary arterial relaxation and guanylate cyclase activation. *Am J Physiol* 1987; 252, pp. H721–H732.

Cahill P, Foster C, Redmond E, Gingalewski C, Wu Y, and Sitzmann J. Enhanced nitric oxide synthase activity in portal hypertensive rabbits. *Hepatology* 22:598-606; 1995.

Cahill PA, Redmond EM and Sitzmann JV. Endothelial dysfunction in cirrhosis and portal hypertension. *Pharmacol Ther* 2001; 89, pp. 273–293.

Cahill PA, Redmond EM, Hodges R, Zhang S and Sitzman JV. Increased endothelial nitric oxide synthase activity in the hyperemic vessels of portal hypertensive rats. *J Hepatol* 1996; 25: 370-378.

Calver A, Harris A, Maxwell JD and Vallance P. Effect of local inhibition of nitric oxide synthesis on forearm blood flow and dorsal hand vein size in patients with alcoholic cirrhosis. *Clin Sci.* 1994; 86: 203-208 1994;

Campillo B, Chabrier PE, Pelle G, Sediame S, Atlan G, Fouet P and Adnot S. Inhibition of nitric oxide synthesis in the forearm arterial bed of patients with advanced cirrhosis. *Hepatology* 1995; 22:1423-1429.

Castro A, Jimenez W, Claria J, Ros J, Martinez JM, Bosch M, Arroyo V, Piulats J, Rivera F and Rodes J. Impaired responsiveness to angiotensin II in experimental cirrhosis: role of nitric oxide. *Hepatology* 1993, 18:367-372.

Chauhan S, Rahman A, Nilsson H, Clapp L, Macallister R, and Ahluwalia A. NO contribution to EDRF-like response in rat small arteries: a role for NO stores. *Cardiovasc Res* 2003; 57:207-216.

Chen MF, Mo LR, Lin RC, Kuo JY, Chang KK, Liao C and Lu FJ. Increase of resting levels of superoxide anion in the whole blood of patients with decompensated liver cirrhosis. *Free Radic Biol Med* 1997; 23, pp. 672–679.

Chen MM, Ashley EA, Deng DX, Tsalenko A, Deng A, Tabibiazar R, Ben-Dor A, Fenster B, Yang E, King JY, Fowler M, Robbins R, Johnson FL, Bruhn L, McDonagh T, Dargie H, Yakhini Z, Tsao PS, and Quertermous T. Novel role for the potent endogenous inotrope apelin in human cardiac dysfunction. *Circulation.* 2003; 108: 1432 – 1439

Cheng RT and Podolsky DK. Capítulo 289. Cirrosis y sus complicaciones. *Harrison Principios de Medicina Interna*, 16ª Edición. 2006

Claria J, Jimenez W, Ros J, Asbert M, Castro A, Arroyo V, Rivera F, and Rodés J. Pathogenesis of arterial-hypotension in cirrhotic rats with ascites - role of endogenous nitric-oxide HEPATOLOGY 1992; 15 (2): 343-349.

Claria J, Jiménez W, Ros J, Rigol M, Angeli P, Arroyo V, Rivera F, and Rodés J. Increased nitric oxide-dependent vasorelaxation in aortic rings of cirrhotic rats with ascites. Hepatology 1994; 20:1615-1621.

Colle IO, De Vriese AS, Van Vlierberghe HR, Lameire NH and De Vos MN. Vascular hyporesponsiveness in the mesenteric artery of anaesthetized rats with cirrhosis and portal hypertension: an in-vivo study. Eur J Gastroenterol Hepatol 2004; 16:139-145.

Dai J, Meij JTA, Dhalla V and Panagia V. Involvement of thiol groups in the impairment of cardiac sarcoplasmic reticular phospholipase D activity by oxidants. J Lipid Mediat Cell Signal 1995; 11, pp. 105–118.

Davidge ST, Ojimba J, and McLaughlin MK. Vascular function in the vitamin E-deprived rat - An interaction between nitric oxide and superoxide anions. Hypertension 1998; 31 (3): 830-835.

Elliott SJ, Lacey DJ, Chilian WM and Brzezinska AK. Peroxynitrite is a contractile agonist of cerebral artery smooth muscle cells. Am J Physiol: Heart Circ Physiol 1998; 275, pp. H1585–H1591.

FARRERAS V. Medicina Interna. Decimoquinta edición. Elsevier España 2004.

Ferenci P. Treatment of hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis of the liver. Digest Dis 1996; 14 suppl. 1, pp. 40–52.

Fernando B, Marley R, Holt S, Anand R, Harry D, Sanderson P, Hamilton G, and Moore K. N-acetylcysteine prevents development of the hyperdynamic circulation in the portal hypertense rat. Hepatology 1998; 28: 689-694.

Foldes G, Horkay F, Szokodi I, Vuolteenaho O, Ilves M, Lindstedt KA, Sarman B, deChatel R, Ruskoaho H, and Toth M. Circulating and cardiac levels of

apelin, novel ligand of the orphan receptor APJ, in patients with heart failure. American Journal of Hypertension 16 (5): 15A-15A OR33 Part 2, MAY 2003

Gadano AC, Albornoz LE, Motta AB, Alvarez D, Estevez A, Bandi JC, McCormack L, Matera J, Bonofiglio CF, Ciardullo M, De Santibanes E, and Gimeno M. Nitric oxide synthase activity is increased in patients with cirrhosis: Relationship with hemodynamic changes. HEPATOLOGY 1999; 30 (4): 293A-293A 531 Part 2 Suppl. S.

Gadano AC, Sogni P, Heller J, Moreau R, Bories Pn, and Lebrec D. Vascular nitric oxide production during the development of two experimental models of portal hypertension. J Hepatol. 1999 May; 30(5):896-903.

Garcia-Estan J, Atucha NM, and Groszmann RJ. Renal response to methoxamine in portal hypertensive rats: Role of prostaglandins and nitric oxide. J Hepatology 1996; 25 (2): 206-211.

Gazawi H, Ljubuncic P, Cogan U, Hochgraff E, Ben-Shachar D and Bomzon A. The effects of bile acids on β -adrenoceptors, fluidity and the extent of lipid peroxidation in rat cardiac membranes. Biochem Pharmacol 2000; 59, pp. 1623–1628.

Graupera M, Garcia-Pagan J-C, Pares M, Abrales Jg, Rosello J, Bosch J, and Rodes J. Cyclooxygenase-1 inhibition corrects endothelial dysfunction in cirrhotic rat livers. J Hepatol 2003; 39:515-521.

Griendling KK and Fitzgerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury. Part I: Basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. Circulation 2003; 108:1912-1916.

Griendling KK, Sorescu D, and Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. Circ Res. 2000; 86:494-501.

Hadoke PW, and Hayes PC. In vitro evidence for vascular hyporesponsiveness in clinical and experimental cirrhosis. Pharmacol Ther 1997; 75:51-68.

Hadoke PWF, Dillon JF, John TG, Walker SWW, Williams BC and Hayes PC. Hepatic arteries from cirrhotic patients are not hyporesponsive to vasoconstrictors. *Hepatology* 1996a; 24 (4): 74-74 Part 2 Suppl. S, OCT.

Hadoke PWF, Dillon JF, Walker SW, Williams BC, John TG, and Hayes PC. Hyporesponsiveness to alpha-adrenoceptor agonists in cirrhotic patients is not evident when human hepatic and mesenteric arteries are studied in vitro. *Br J Pharmacol.* 1996b; 117: P111-P111 Suppl. S, APR.

Hadoke, P.W.F. Cirrhosis of the liver and receptor-mediated function in vascular smooth muscle. *Pharmacol Ther* 2001; 89, pp. 233–254.

Halversen JF, and Myking AO. The porto-systemic collateral pattern in the rat: an angiographic and anatomic study after partial occlusion of the portal vein. *Eur Surg Res.* 1974; 6:183-195.

Hamilton CA, Howie CA, Jardine E and Reid JL. Endothelium dependent and endothelium independent relaxation of aortic rings from Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits after exposure to free radical generating system. *Free Radic Res* 1998; 28, pp. 251–257.

Heinemann A and Stauber RE. Vasodilator responses to nitric oxide are enhanced in mesenteric arteries of portal hypertensive rats. *Eur J Clin Invest* 1996; 26:824-826.

Heinemann A, Wachter C, Holzer P, Fickert P, and Stauber RE. Nitric oxide-dependent and –independent vascular hyporeactivity in mesenteric arteries of portal hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 1997; 121:1031-1037.

Heller J, Schepke M, Molderings G, Muller A, Spengler U, and Sauerbruch T. Alpha(1)-adrenergic vascular reactivity is reduced in isolated rings of the hepatic artery and the portal vein from patients with liver cirrhosis. *Hepatology* 1996; 24 (4): 315-315 Part 2 Suppl. S, OCT.

Henriksen JH, Ring-Larsen H and Christensen NJ. Sympathetic nervous activity in cirrhosis. A survey of plasma catecholamine studies. *J Hepatol* 1985; 1, pp. 55–65.

Hori N, Wiest R, and Groszmann R. Enhanced Release of Nitric Oxide in Response to Changes in Flow and Shear Stress in the Superior Mesenteric Arteries of Portal Hypertensive Rats. *Hepatology* 28: 1467-1473; 1998.

Hou MC, Cahill PA, Zhang S, Wang YN, Hendrickson RI, Redmon EM, and Sitzmann JV. Enhanced cyclooxygenase-1 expression within the superior mesenteric artery of portal hypertensive rats: role in the hyperdynamic circulation. *Hepatology* 1998; 2:20-27.

Hua C and Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases. The role of oxidant stress. *Circ Res* 2000 Nov 10;87(10):840-844. Review.

Huang YT, Hsu YC, Chen CI, Liu CT, and Wei YH. Oxidative-stress related changes in the livers of bile-duct-ligated rat. *J Biomed Sci* 2003; 10:170-178.

Hubel CA, Davidge ST and McLaughlin MK. Lipid hydroperoxides potentiate mesenteric artery vasoconstrictor responses. *Free Radic Biol Med* 1993; 14, pp. 397–407.

Iesaki T, Gupte SA, Kaminski PM and Wolin MS. Inhibition of guanylate cyclase stimulation by NO and bovine arterial relaxation to peroxynitrate and H₂O₂. *Am J Physiol* 1999; 277, pp. H978–H985.

Iwata F, Joh T, Kawai T, and Itoh M. Role of EDRF in splanchnic blood-flow of normal and chronic portal hypertensive rats. *Am J Physiol* 1992; 263 (2): G149-G154 Part 1.

Jalan R, Newby DE, Masumori S, Hayes PC, Boon NA, and Webb DJ. Impaired central but stimulated humoral regulation of vascular tone in patients with cirrhosis and ascites. *Hepatology* 1996; 24 (4): 1297-1297 Part 2 Suppl. S, OCT.

Jeng L -B.B, Pj Lin, P-C Yao, K-T Tsai, W-C Lee, M-F Chen, and C.-H Chang. Impaired endothelial - dependent relaxation by acetylcholine after preservation of the human hepatic artery with UW solution. Transplantation Proceedings 1996, Vol 28, No 3, 1895-1896.

Jensen LS, Juhl CO, and Mulvany MJ. Mechanical, morphological and pharmacological properties of esophageal-varices and small mesenteric veins in portal hypertensive rabbits. Acta Physiol Scand. 1987; 130 (4): 649-656 AUG.

Kagiyama S, Fukuhara M, Matsumura K, Lin YZ, Fujii K, and Iida M. Central and peripheral cardiovascular actions of apelin in conscious rats. Hypertension 2004; 44 (4): 541-541 P136.

Karatapanis S, McCormick PA, Kakad S, Chin JKT, Islam M, Jeremy J, Harry D, McIntyre N, Burroughs AK, and Jacobs M. Alteration in vascular reactivity in isolated aortic rings from portal vein-constricted rats. Hepatology 1994; 20 (6): 1516-1521 DEC.

Katugampola SD, Maguire JJ, Matthewson SR, and Davenport. AP[I-125]-(Pyr(1))Apelin-13 is a novel radioligand for localizing the APJ orphan receptor in human and rat tissues with evidence for a vasoconstrictor role in man. British J Pharmacology 132 (6): 1255-1260 MAR 2001

Kiel JW, Pitts V, Benoit JN, Granger DN, and Shepherd AP. Reduced vascular sensitivity to norepinephrine in portal hypertensive rats. Am J Physiol 1985; 248:G192-G195.

Kleinz MJ and Davenport AP. Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endocardial endothelial cells. Peptides Regulatory 2004; 118:3 119-125.

Kojda G and Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species; pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. Cardiovasc Res 1999; 43:562-571.

Laragh JH, Meltzer JI, Cannon PI, Sicinski AM and Bentzel CJ. Angiotensin II, norepinephrine, and renal transport of electrolytes and water in normal man and in cirrhosis with ascites. *J Clin Invest.* 1963; 42 (7): 1179-& .

Lee FY, Albillos A, Colombato LA, and Groszmann RJ. The role of nitric-oxide in the vascular hyporesponsiveness to methoxamine in portal hypertensive rats. *Hepatology* 1992; 16 (4): 1043-1048.

Lee FY, Sieber CC, Lopezalavera JC, and Groszmann RJ. Chronic nitric-oxide inhibition corrects the increased capillary-permeability observed in portal hypertensive rats. *Gastroenterology* 1993; 104 (4): A258-A258 Suppl. S.

Lenz K, Hortnagl H, Magometschnigg D, Kleinberger G, Druml W, Laggner A. Function of the autonomic nervous-system in patients with hepatic-encephalopathy. *Hepatology* 1985; 5 (5): 831-836.

Ljubuncic P, Tanne Z and Bomzon A. Evidence of a systemic phenomenon for oxidative stress in cholestatic liver disease. *Gut* 2000a; 47, pp. 710–716.

Ljubuncic P, Tanne Z and Bomzon A. Ursodeoxycholic acid suppresses the increased extent of lipid peroxidation in the diseased liver in experimental cholestatic liver disease. *Digest Dis Sci* 2000b; 45, pp. 1921–1928.

Ljubuncic P, Tanne Z, Bomzon A. Evidence of a systemic phenomenon for oxidative stress in cholestatic liver disease. *Gut* 2000;47:710-716.

López-Novoa JM. Pathophysiological features of the CCl₄/Phenobarbital model of experimental liver cirrhosis in rats. In: *The Kidney in Liver Disease*, 1988; 3rd edn., pp.305-327, Epstein, M. (ed.) Williams and Wilkins, Baltimore.

Lounsbury KM, Hu Q and Ziegelstein RC. Calcium signaling and oxidant stress in the vasculature. *Free Radic Biol Med* 2000; 28, pp. 1362–1369.

Lunzer MR, Newman SP, Bernard AG, Manghani KK, Sherlock S, and Ginsburg J. Impaired cardiovascular responsiveness in liver disease. *Lancet* 1975; 1:382-385.

MacGilchrist AJ, Sumner D, and Reid JL. Impaired pressor reactivity in cirrhosis - evidence for a peripheral vascular defect. *Hepatology* 1991; 13 (4): 689-694.

Martin P, Ohara M, Gines P, XU D, St. John, Niederberger M, Schrier R. Nitric oxide synthase (NOS) inhibition for one week improves renal sodium and water excretion in cirrhotic rats with ascites. *J Clin Invest* 101:235-242; 1998.

Martin P, XU D, Niederberger M, Weigert A, Tsai P, ST Jhon J, Gines P, Schrier R. Upregulation of endothelial constitutive NOS: a major role in the increased NO production in cirrhotic rats. *Am J Physiol* 1996; 270: F494-F499.

Mathie RT, Ralevic V, Moore KP, and Burnstock G. Mesenteric vasodilator responses in cirrhotic rats: a role of nitric oxide?. *Hepatology* 1996; 23:130-136.

Matos J, Andre M, Rembold S, Caldeira F, and Lugon J. Effects of dialyzer reuse on permeability of low-flux membranes. *Am J Kidney Dis* 2000; 35: 366-9.

Michielsen PP, Boeckxstaens GE, Sys SU, Herman AG and Pelckmans PA. Role of nitric-oxide in hyporeactivity to noradrenaline of isolated aortic rings in portal hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 1995a; 273 (1-2): 167-174.

Michielsen PP, Boeckxstaens GE, Sys SU, Herman AG, and Pelckmans PA. The role of increased nitric-oxide in the vascular hyporeactivity to noradrenaline in long-term portal-vein ligated rats. *J Hepatology* 1995b; 23 (3): 341-347 SEP.

Migdely S, Grant IS, Haynes WG and Webb DJ. Nitric oxide liver failure. *Lancet* 1991; 337:776.

Morales-Ruiz M, Jiménez W, Pérez-Sala D, Ros J, Leivas A, Lamas S, Rivera F, and Arroyo V. Increased nitric oxide synthase expression in arterial vessels of cirrhotic rats with ascites. *Hepatology* 1996; 24: 1481-1486.

Morgan TR, Morgan K, Jonas GM, and Thillainadarajah I. Atrial-natriuretic-factor in experimental cirrhosis in rats. *Gastroenterology* 1992; 102 (4): 1356-1362 Part 1.

Mugge A, Elwell JH, Peterson TE, Hofmeyer TG, Heistad DD, and Harrison DG. Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Circ Res.* 1991; 69:1293-1300.

Murphy, M.P., Packer, M.A., Scarlett, J.L. and Martin, S.W. Peroxynitrite: a biologically significant oxidant. *Gen Pharmacol* 1998; 31, pp. 179–186.

Niederberger M, Gines P, Martin P, Tsai P, Morris K, Mcmurtry I, Schrier R. Comparison of vascular nitric oxide production and systemic hemodynamics in cirrhosis versus prehepatic portal hypertension in rats. *Hepatology* 24: 947-951, 1996.

Nuttall SL, Martin U, Sinclair AJ and Kendall MJ. Glutathione: in sickness and in health. *Lancet* 1998; 351, pp. 645–646.

Oberti F, Sogni P, Cailmail S, Moreau R, Pipy B, Lebrec D. Role of prostacyclin in hemodynamic-alterations in conscious rats with extrahepatic or intrahepatic portal-hypertension. *Hepatology* 1993; 18 (3): 621-627.

Pagano PJ, Griswold MC, Najibi S, Marklund SL, and Cohen RA. Resistance of endothelium-dependent relaxation to elevation of O₂(-) levels in rabbit carotid artery. *American journal of physiology-heart and circulatory physiology* 1999; 277 (5): H2109-H2114.

Patel RP, McAndrew J, Sellak H, White CR, Jo HJ, Freeman BA and Darley-Usmar VM. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta: Bioenergetics* 1999; 1411, pp. 385–400.

Pelaez, N.J., Braun, T.R., Paul, R.J., Meiss, R.A. and Packer, C.S. H₂O₂ mediates Ca²⁺ and MLC20 phosphorylation-independent contraction in intact and permeabilized vascular muscle. *Am J Physiol: Heart Circ Physiol* 2000; 279, pp. H1185–H1193.

Pizcueta MP, Casamitjana R, Bosch J, and Rodés J. Decreased systemic vascular sensitivity to norepinephrine in portal hypertensive rats: role of hyperglucagonism. *Am J Physiol* 1990; 258:G191-G195.

Pizcueta P, Pique JM, Fernandez M, Bosch J, Rodes J, Whittle BIR, and Moncada S. Modulation of the hyperdynamic circulation of cirrhotic rats by nitric-oxide inhibition. *Gastroenterology* 1992; 103 (6): 1909-1915.

Procter E and Chatamra K. High yield micronodular cirrhosis in the rat. *Gastroenterology* 1982; 83: 1183-1190.

Rastegar H, Jorjani M, Roushanzamir F, Ahmadiani A, Namiranian K, and Dehpour AR. Time-dependent reduction of acetylcholine-induced relaxation in aortic rings of cholestatic rats. *Pharmacological Research* 2001; 44 (6): 519-525.

Reaux A, De Mota N, Skultetyova I, Lenkei Z, Gallatz K, Corvol P, Palkovits M, Llorens-Cortes C. Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J. Neurochem.* 2001;77:1085-1096.

Rhoades RA, Packer CS, Roepke DA, Jin N and Meiss RA. Reactive oxygen species alter contractile properties of pulmonary arterial smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol* 1990; 68, pp. 1581–1589.

Rockey D. The cellular pathogenesis of portal hypertension: stellate cell contractility, endothelin, and nitric oxide. *Hepatology* 1997, 25:2-5.

Rodriguez-Martinez MA, Garcia-Cohen EC, Baena AB, Gonzalez R, Salaices M and Marin J. Contractile responses elicited by hydrogen peroxide in aorta from normotensive and hypertensive rats. Endothelial modulation and mechanism involved. *Br J Pharmacol* 1998; 125, pp. 1329–1335.

Rosser BG and Gores GJ. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 1995; 108, pp. 252–275.

Rubanyi GM and Vanhoutte PM. Oxygen-derived free radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am J Physiol* 1986; 250, pp. H815–H821.

Rubin E and Lieber Cs. Fatty Liver, Alcoholic hepatitis and Cirrhosis produced by alcohol in primates. *N Engl J Med.* 1974; 290 (3): 128-135.

Ryan J, Sudhir K, Jennings G, Esler M, and Dudley F. Impaired reactivity of the peripheral vasculature to pressor agents in alcoholic cirrhosis. *Gastroenterology* 1993; 105 (4): 1167-1172.

Safka V, Moreau R, Gadano A, and Lebrec D. Vascular hyporesponsiveness to vasodilators in rats with cirrhosis. *J Hepatology* 1997; 26 (2): 382-386.

Sarela AI, Mihaimeed FMA Batten JJ, Davidson BR and Mathie RT. Hepatic and splanchnic nitric oxide activity in patients with cirrhosis. *Gut* 1999; 44(5):749-753.

Schrier RW and Caramelo C. Haemodynamic and hormonal alterations in hepatic cirrhosis. In: *The Kidney in liver Disease*, 3rd edn., 1988. Ch. 11, pp.265-285, Epstein, M (ed.) Williams and Wilkins, Baltimore.

Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, Epstein M, Henriksen JH, and Rodes J. Peripheral arterial vasodilation hypothesis - a proposal for the initiation of renal sodium and water-retention in cirrhosis. *Hepatology* 1988, 8 (5): 1151-1157

Seyedabadi M, Goodchild AK, and Pilowsky PM. Site-specific effects of apelin-13 in the rat medulla oblongata on arterial pressure and respiration. *Autonomic Neuroscience-Basic & Clinical* 2002; 101 (1-2): 32-38.

Shah V. Cellular and molecular basis of portal hypertension. *Clin Liver Dis* 2001; 5: 629-644.

Shen JZ, Zheng XF and Kwan CY. Differential contractile actions of reactive oxygen species on rat aorta: selective activation of ATP receptor by H₂O₂. *Life Sci* 2000; 66, pp. PL291–PL296.

Sieber C and Groszmann RJ. Nitric oxide mediates in vitro hyporeactivity to vasopressors in mesenteric vessels of portal hypertensive rats. *Gastroenterology* 1992; 103:235.

Sieber C, Lopez-Talavera JC and Groszmann RJ. Role of nitric oxide in the in vitro splanchnic hyporeactivity in ascitic cirrhotic rats by nitric oxide inhibition. *Gastroenterology* 1993; 104:1750.

Singal PK, Beamish RE and Dhalla NS. Potential oxidative pathways of catecholamines in the formation of lipid peroxides and genesis of heart disease. *Adv Exp Med Biol* 1983; 161, pp. 391–395.

Singal PK, Kapur N, Dhillon KS, Beamish RE and Dhalla NS. Role of free radicals in catecholamine-induced cardiomyopathy. *Can J Physiol Pharmacol* 1982; 60, pp. 1390–1397.

Sitzmann JV, Bulkley GB, Mitchell MC, and Campbell K. Role of prostacyclin in the splanchnic hyperemia contributing to portal hypertension. *Ann Surg* 1989; 209:322-327.

Smith REA, McPeake JR, Gimson AE, Martin JF, Williams R and Moncada S. Nitric oxide and the haemodynamic changes in hepatic failure. *Gut* 34:S20. 1993a.

Smith REA, McPeake JR, Gimson AE, Martin JF, Williams R and Moncada S. Nitric oxide and the haemodynamic changes in hepatic failure. *Endothelium* 1 (Suppl.). S90. 1993b.

Smith REA, Robinson NMK, McPeake JR, Baylis SA, Charles IG, Heaton ND, Moncada S, Williams R, and Martin JF. Induction and role of NO synthase in hypotensive hepatic failure. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 1997; 17 (11): 3079-3082.

Sogni P, Sabry S, Moreau R, Gadano A, Lebrec D, and Dinh Xuan AT. Hyporeactivity of mesenteric resistance arteries in portal hypertensive rats. *J HEPATOL* 1996; 24 (4): 487-490

Sogni P, Smith APL, Gadano A, Lebrec D, and Higenbottam TW. Induction of nitric oxide synthase II does not account for excess vascular nitric oxide production in experimental cirrhosis. *J Hepatology* 1997; 26 (5): 1120-1127.

Szokodi I, Tavi P, Foldes G, Voutilainen-Mylly S, Ilves M, Tokola H, Pikkarainen S, Piuhola J, Rysa J, Toth M, and Ruskoaho H. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circulation Research* 2002; 91 (5): 434-440.

Szuster-Ciesielska A, Daniluk J, And Kandefer-Szerseń NM. Oxidative stress in the blood of patients with alcohol-related liver cirrhosis. *Med Sci Monit* 2002; 8:CR419-CR424.

Taheri S, Murphy K, Cohen M, Sujkovic E, Kennedy A, Dhillon W, Dakin C, Sajedi A, and Ghatei M. Bloom S The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 2002; 291 (5): 1208-1212.

Taniyama Y and Griending KK. Reactive oxygen species in the vasculature. Molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*. 2003; 42(6):1075-1081. Epub 2003 Oct 27. Review.

Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S, Hinuma S, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, and Fujino M. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1998; 251 (2): 471-476.

Tatemoto K, Takayama K, Zou MX, Kumaki I, Zhang W, Kumano K, and Fujimiya M. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regulatory Peptides* 2001; 99 (2-3): 87-92

Tsukamoto H, Matsuoka M, and French SW. Experimental models of hepatic fibrosis. *Sem. Liv. Dis.* 1991; 10:56-65.

Vane JR, Anggard EE and Botting RM. Mechanisms of disease - regulatory functions of the vascular endothelium. *New England Journal Of Medicine* 1990; 323 (1): 27-36.

Vaughan RB, Angus JA, and Angus PW. Vasoconstrictor responses are normal but prostanoid-mediated vasodilatation is enhanced in human cirrhotic mesenteric arteries. *J Gastroenterology And Hepatology* 2005; 20 (8): 1158-1164.

Vilar GE, Oramasb, and Llanio NR. Bases fisiopatológicas de la insuficiencia hepática aguda. *Rev cubana med*, jul.-ago. 2004, vol.43, no.4, p.0-0. ISSN 0034-7523

Wang G, Anini Y, Wei W, Oi X, OCarroll AM, Mochizuki T, Wang HQ, Hellmich MR, Englander EW, Greeley GH Jr. Apelin, a new enteric peptide: localization in the gastrointestinal tract, ontogeny, and stimulation of gastric cell proliferation and of cholecystokinin secretion. *Endocrinology*, 2004;145:1342-1348.

Wei EP, Kontos HA and Beckman JS. Antioxidants inhibit ATP-sensitive potassium channels in cerebral arterioles. *Stroke* 1998; 29, pp. 817–822.

Wei EP, Kontos HA and Beckman JS. Mechanisms of cerebral vasodilation by superoxide, hydrogen peroxide, and peroxynitrite. *Am J Physiol: Heart Circ Physiol* 1996; 271, pp. H1262–H1266.

Wiest R and Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatology* 2002;35(2):478-491. Review.

Wiest R, Hori N, Cadelina G, Das S, and Grozmann R. Increased nitric oxide release in response to vasoconstrictors in the superior mesenteric arterial bed of cirrotic rats. *Hepatology* 26:A390; 1997.

Yang BC, Li DY, Weng YF, Lynch J, Wingo CS and Mehta JL. Increased superoxide anion generation and altered vasoreactivity in rabbits on low-potassium diet. *Am J Physiol: Heart Circ Physiol* 1998; 274, pp. H1955–H1961.

Yang ZW, Zhang A, Altura BT and Altura BM. Endothelium-dependent relaxation to hydrogen peroxide in canine basilar artery: a potential new cerebral dilator mechanism. *Brain Res Bull* 1998; 47, pp. 257–263.

Yang ZW, Zheng T, Wang J, Altura BT and Altura BM. Hydrogen peroxide induces contraction and raises $[Ca^{2+}]_i$ in canine cerebral arterial smooth “muscle” participation of cellular signaling pathways. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1999; 360, pp. 646–653.

Zern MA, Saber MA, and Shafritz DA. Molecular mechanisms for changes in hepatic protein-synthesis induced by schistosomiasis infection in mice. *Biochemistry* 1983; 22 (26): 6072-6077.

Zygmunt Pm, Ryman T, And Hogestatt Ed. Regional differences in endothelium-dependent relaxation in the rat: contribution of nitric oxide and nitric oxide-independent mechanisms. *Acta Physiol Scand* 1995; 155:257-266.